

**Aus dem Zentrum für operative Medizin
Klinik für Visceral-, Thorax- und Gefäßchirurgie**

Direktor: Prof. Dr. med. D. K. Bartsch

**des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg**



**In vitro Evaluation der Wirkung von Proteasominhibitoren auf
Schilddrüsenkarzinomzellen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von:

Tjadina Arndt aus Celle
Marburg 2014

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 12.09.2014
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer
Referent: Herr PD Dr. S. Hoffmann
Korreferent: Herr Prof. Dr. Steinhoff

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Einführung	1
1.2	Das Schilddrüsenkarzinom	2
1.2.1	Epidemiologie.....	2
1.2.2	Histologische Einteilung, Ätiologie und Prognose	3
1.2.3	Diagnostik.....	5
1.2.4	Therapie	6
1.3	Molekulare Aspekte	7
1.3.1	Allgemeine Funktion und Aufgabe des Proteasoms	8
1.3.2	Proteasominhibitoren als antineoplastische Therapeutika.....	11
1.3.3	Bortezomib PS-341 (Velcade®).....	13
1.3.4	Bortezomib und klinische Studien.....	20
1.4	Fragestellung und Zielsetzung	23
2	Material und Methoden	24
2.1	Material	24
2.1.1	Verwendete Zellen.....	24
2.2	Methoden	24
2.2.1	Zellkultur	24
2.2.2	Versuche zur Zellproliferation mittels MTT-Test	25
2.2.3	Caspase 3/7 Assay Promega.....	27
2.2.4	Humaner Apoptose Array.....	29
2.2.5	Zellzyklusanalyse mit Propidiumiodid und Durchflusszytometrie	33
2.2.6	NFκB p65 Transcription Factor Assay Kit.....	35
2.2.7	Prinzip des NFκBp65 Transcription Factor Assay Kit.....	37

2.2.8	Proteinchemische Methoden.....	39
2.2.9	BCA-Protein Assay	40
2.2.10	Western Blot	41
2.2.11	Statistik	47
3	Ergebnisse	48
3.1	Ergebnisse zur Proliferation.....	48
3.2	Ergebnisse zur Caspase-3-Aktivität.....	53
3.3	Ergebnisse zum Apoptose Array	55
3.4	Ergebnisse der Zellzyklusanalyse	61
3.5	Ergebnisse zur NFκB-Aktivität	67
3.6	Ergebnisse zu Western Blot-Analysen	70
3.6.1	GRP78 (<i>Glucose-regulated Protein 78kDa</i>)-Expression	70
3.6.2	CHOP (CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein).....	73
4	Diskussion.....	76
4.1	Zellproliferation	77
4.2	Caspase-3-Aktivität	79
4.3	Apoptose Protein Array	81
4.4	Zellzyklusarrest.....	86
4.5	NFκB-Aktivität	87
4.6	Western Blot Analyse	89
4.7	Ausblick	92
5	Zusammenfassung	95
6	Abstract	96
7	Anhang.....	98
7.1	Materialliste	98
7.1.1	Zellkultur	98

7.1.2	Substanzen und Chemikalien	99
7.1.3	Kits und Antikörper	100
7.1.4	Puffer und Lösungen	103
7.1.5	Geräte und Einwegmaterial	105
7.2	Literaturverzeichnis	108
7.3	Verzeichnis meiner akademischen Lehrer	125
7.4	Danksagung	126

I Abkürzungsverzeichnis

CR	komplette Remission
CDK	Cyclin abhängige Kinase
CDKI	Cyclin abhängige Kinase Inhibitor
DEVD	Asparaginsäure- Glutaminsäure-Valin-Asparaginsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FCS	Fetal Calf Serum
FGM	Full growth Medium
FNAC	Feinnadelaspirationszytologie
GRP78	Glucose-regulated Protein 78kDa
GSH	Glutathion
IAP	Inhibitor apoptosis protein
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
IκBa	Inhibitorische κB-Proteine
IL-6, IL-8	Interleukin-6, Interleukin-8
MDa	Megadalton
MM	Multiples Myelom
MR	Geringe Reduktion
NCI	National Cancer Institute
PR	Teilweise Reduktion
RAS	Rat sarcoma
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Thr	Threonin
TSH	Thyreidea stimulierendes Hormon
UPP	Ubiquitin Proteasom Pathway
VEGF	Vascular endothelial growth factor

1 Einleitung

1.1 Einführung

Unter den endokrinen Tumoren ist das Schilddrüsenkarzinom der häufigste bösartige Tumor und weist zugleich eine steigende Inzidenz auf (Davies & Welch, 2006). Etwa 94 % der Schilddrüsenkarzinome gehen von den Follikelepithelzellen aus, wobei die differenzierten papillären und follikulären Schilddrüsenkarzinome am häufigsten auftreten. Die Therapieoptionen für die differenzierten Karzinome sind mit der Möglichkeit einer Operation kombiniert mit einer Radiojodtherapie und einer TSH (Thyreidea stimulierendes Hormon) supprimierenden Levothyroxin-Behandlung gut. Sie weisen meistens eine sehr gute Prognose mit 5-Jahres-Überlebensraten von > 95 % auf.

Das anaplastische Karzinom macht unter den Schilddrüsenkarzinomen zwar nur 1,6 % aus, zählt jedoch zu den aggressivsten Tumoren beim Menschen und zeichnet sich durch ein rasches, lokal destruierendes Wachstum sowie eine frühe lymphogene und hämatogene Metastasierung aus. Trotz multimodaler Therapieansätze mit chirurgischer Intervention und gegebenenfalls kombinierter Radiochemotherapie beträgt das mediane Überleben nur drei bis sechs Monate. Da das anaplastische Karzinom in der Regel nicht am Jodstoffwechsel teilnimmt, entfällt die Option einer Radiojodtherapie, sodass bisher noch keine effektive Therapie zur Verfügung steht. Angesichts des schlechten klinischen Verlaufs von Patienten mit anaplastischen Karzinomen ist es unbedingt notwendig neue innovative und effektive Behandlungsoptionen zu entwickeln, um in Zukunft auch dieser Patientengruppe bessere therapeutische Möglichkeiten bieten zu können.

Durch verstärkte präklinische und klinische Forschungen wurden neue Erkenntnisse in der Entstehung von Schilddrüsentumoren gewonnen. Zusammen mit der Entwicklung neuer Substanzen hinsichtlich der Therapie von Tumoren, die zielgerichtet verschiedene molekulare Signalwege angreifen können, die für die Entstehung von Malignitäten verantwortlich gemacht werden, ergaben sich auch für das anaplastische Schilddrüsenkarzinom neue Hoffnungen eine effektive Behandlungsoption zu finden. Eine Klasse der vielversprechenden, neuen Substanzen sind die *small molecules* zu

denen auch die Proteasominhibitoren zählen. Das Ubiquitin-Proteasom-System ist verantwortlich für die Degradierung von eukaryontischen zellulären Proteinen. Dieser ATP (Adenosin-Triphosphat) abhängige Prozess ist entscheidend für das normale Funktionieren und Überleben einer Zelle sowie die Regulation des Zellzyklus. In malignen Zellen konnte eine vermehrte Aktivität des Proteasoms festgestellt werden. Diese Tatsachen berücksichtigend stellt das Proteasom ein aussichtsreiches Ziel in der Behandlung von malignen Tumoren dar. Bortezomib ist der erste Proteasominhibitor dieser Klasse, der die Stufe der klinischen Studien erreichte und seit 2003 in der Behandlung des Multiplen Myeloms und ebenso des Mantelzelllymphoms eingesetzt wird. Auch gegenüber soliden Tumoren sind die ersten präklinischen und klinischen Untersuchungen vielversprechend. Dies, so wie die Tatsache, dass erste Testungen von Proteasominhibitoren an Schilddrüsenkarzinomzellen aussichtsreiche Ergebnisse lieferten, rechtfertigt die Prüfung für einen möglichen Einsatz auch bei anaplastischen Schilddrüsenkarzinomen.

1.2 Das Schilddrüsenkarzinom

1.2.1 Epidemiologie

Das Schilddrüsenkarzinom ist der häufigste maligne Tumor der endokrinen Organe und weist zugleich eine weltweit steigende Inzidenz auf (Aschebrook-Kilfoy et al., 2011). Gemessen an allen malignen Tumoren beträgt der Anteil des Schilddrüsenkarzinoms ca. 1 % (Davies & Welch, 2006; Köhrle, 2004; Reiners et al., 2005). Pro Jahr erkranken in der Bundesrepublik etwa 3500 Frauen und 1500 Männer. Das Lebenszeitrisko an Schilddrüsenkrebs zu erkranken ist bei Frauen (0,7 %) im Vergleich zu Männern (0,3 %) mehr als doppelt so hoch. Die erfasste altersstandardisierte Inzidenz für Deutschland betrug 2008 3,5/100000 bei den Männern und 8,6/100000 bei den Frauen. Während im Zeitraum von 1999 bis 2008 die Sterberate bei Frauen und Männern in geringem Maße abgenommen hat, hat die Zahl der Neuerkrankungen und die altersstandardisierte Erkrankungsrate bei beiden Geschlechtern zugenommen. In anderen Ländern, wie England, Österreich und den USA ist diese Tendenz ebenso zu beobachten und auch dort liegen die Inzidenzraten für Frauen höher als die für Männer. Das mittlere Erkrankungsalter lag 2008 für Frauen bei 52 Jahren und für Männer bei 56 Jahren,

womit der Erkrankungsgipfel weit unter dem für andere Krebserkrankungen liegt. (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das RKI 2006; Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2012 Robert Koch-Institut, 2012) .

1.2.2 Histologische Einteilung, Ätiologie und Prognose

1.2.2.1 Differenzierte Schilddrüsenkarzinome

Die differenzierten Schilddrüsenkarzinome gehen von den Follikelepithelzellen aus und stellen mit 94 % den größten Anteil der Schilddrüsenkarzinome dar. Sie lassen sich in papilläre und follikuläre Karzinome differenzieren, wobei das papilläre Schilddrüsenkarzinom der häufigere Histiotyp ist. In Jodmangelgebieten steigt jedoch der relative Anteil an follikulären Schilddrüsenkarzinomen. Als wichtigster Risikofaktor für die Entwicklung differenzierter Schilddrüsenkarzinome gilt eine Strahlenexposition in der Kindheit (Schneider & Sarne, 2005), wie bei dem Reaktorunglück von Tschernobyl oder während des zweiten Weltkriegs durch die Atombomben in Hiroshima. Dies beinhaltet auch medizinisch indizierte Bestrahlung, wie beispielsweise bei kindlichen bösartigen Tumoren der Halsregion. Auch die positive Familienanamnese eines erstgradig erkrankten Verwandten stellt einen Risikofaktor dar (Pal et al., 2001). Weiter zeichnet sich vermehrt ab, dass Mutationen oder Neuaneordnungen von Genen, die Proteine des MAPK-Signalwegs (*mitogen-activated protein Kinase*) kodieren, zu der Entwicklung und Progression von differenzierten Karzinomen führen können (Fagin, 2004; Kondo et al. 2006). Die Bedeutung dieses Signalwegs wird dadurch hervorgehoben, dass in 70 % der gut differenzierten Schilddrüsenkarzinome aktivierte Mutationen in *ret/PTC*, *NTRK1*, *Ras* oder *BRAF*-Genen gefunden wurden (Fagin, 2004). Es scheint als zeichneten sich Karzinome mit einer *BRAF*-Mutation durch eine erhöhte Aggressivität aus mit höheren Raten an Lymphknotenmetastasen und klinischen Rückfällen (Xing, 2007). Bei nahezu 40 % der follikulären Karzinome fanden sich Punktmutationen des *RAS* Onkogen (Medema & Bos, 1993) oder *PAX8-PPAR gamma 1* Genumordnungen (Marques et al., 2002), diese beiden Veränderungen treten jedoch nicht gleichzeitig auf.

Papilläre Karzinome kommen häufiger multifokal vor (McCarthy et al., 2006), sind in

80 % der Fälle bilateral lokalisiert und metastasieren vorwiegend lymphogen, oft über die zervikalen Lymphknoten. Follikuläre Karzinome sind hingegen meist solitär lokalisiert und metastasieren vor allem hämatogen in die Lunge, das Skelett und das Gehirn (Boone et al., 2003).

Die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate beträgt nach kombinierter chirurgisch-radiotherapeutischer Behandlung für das papilläre Karzinom ca. 90 % und für das follikuläre Karzinom ca. 80 %. Es ist zu berücksichtigen, dass es unter den differenzierten Karzinomen eine große Anzahl an histologischen Subtypen gibt, die neben der Größe des Tumors, dem Stadium der Erkrankung und dem Tumordifferenzierungsgrad die Prognose beeinflussen. So haben beispielsweise Tumoren von einer Größe zwischen 2 cm und 3,9 cm (T2 nach TNM Klassifikation) eine bessere Prognose als Tumoren von einer Größe zwischen 4 cm und 6,9 cm (T3). Tumoren größer als 7 cm (T4) mit Ausbreitung über die Schilddrüsenkapsel haben die schlechteste Prognose (Pellegriti et al., 2004). Mithilfe der TNM-Klassifikation, nach der alle malignen Tumorentitäten eingeteilt werden, lassen sich die Prognose anhand von 5-Jahresüberlebensraten und das therapeutische Regime bestimmen. T beschreibt dabei die Ausdehnung des Tumors (Größe/ Tiefeninfiltration), N gibt das Fehlen oder Vorhandensein von regionären Lymphknotenmetastasen an und M das Fehlen oder Vorhandensein von Fernmetastasen.

Histologisch zeigt die aggressivere großzellige (*Tall-Cell*) Variante des papillären Schilddrüsenkarzinoms (Ghossein & Livolsi, 2008; Johnson et al., 1988), sowie das onkozytäre Karzinom (Hürthle-Zell-Tumor) eine schlechtere Prognose (Sherman, 2003).

1.2.2.2 Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom

Das anaplastische Schilddrüsenkarzinom (ATC) ist ein undifferenzierter Tumor der Follikelepithelzellen und zählt zu den aggressivsten Karzinomen mit einer krankheits-spezifischen Mortalität von nahezu 100 %. Es ist mit einer Häufigkeit von etwa 1,6 % aller Schilddrüsenkarzinome relativ selten (Ain, 1999). Vermutlich entwickelt sich das anaplastische Schilddrüsenkarzinom aus einem differenzierten Karzinom, vor allem dem papillären, durch eine oder mehrere Dedifferenzierungen (Ricarte-Filho et al., 2009). Es weist außerdem eine Vielzahl an Mutationen auf, so auch in den BRAF- und RAS-Genen wie es auch bei den differenzierten Karzinomen vorkommt. Dies führt zu

der Vermutung, dass dies frühe Ereignisse in der Entstehung von Schilddrüsenkarzinomen sind (Quiros et al., 2005). Zusätzlich weisen anaplastische Karzinome aber noch weitere Mutationen auf, wie beispielsweise im p53 Tumorsuppressorgen (Quiros et al., 2005). Eine Übersicht bietet der Review Artikel: “Gene expression profile of human thyroid cancer in relation to its mutational status“ (Rusinek et al., 2011). Die Metastasierung erfolgt früh sowohl lymphogen und hämatogen u.a. in die Lunge und Leber, das Skelett und Gehirn als auch in hohem Maße kontinuierlich in das umliegende Gewebe. Die mediane Überlebenszeit der Patienten nach Diagnosestellung liegt zwischen drei und sechs Monaten und hängt auch vom Stadium der Erkrankung ab. So liegt sie beispielsweise bei Patienten mit Fernmetastasen (50 % der Patienten) bei nur drei Monaten (Ain, 1999). Prognoseverbessernde Therapieoptionen, die auf belastbaren Untersuchungen beruhen, existieren derzeit keine. Einzelne Publikationen von kleinen Serien mit innovativen, multimodalen Therapieansätzen, wie der intensitätsmodulierten Strahlentherapie (IMRT) und darauffolgender adjuvanter Chemotherapie, zeigten erste Erfolge bezüglich einer längeren Überlebenszeit der Patienten (Foote et al., 2011). Ein weiterer Histiotyp des Schilddrüsenkarzinoms ist das medulläre Karzinom, ein neuroendokriner Tumor, der von den C-Zellen und nicht von den Schilddrüsenfollikelzellen ausgeht. Dieser ebenfalls sehr aggressive Tumor macht 5 % aller Schilddrüsenkarzinome aus und soll der Vollständigkeit halber erwähnt werden (Sherman, 2003).

1.2.3 Diagnostik

Die Diagnostik von Schilddrüsenkarzinomen basiert neben der Anamnese und Palpation, bei der derbe, schnell wachsende, nicht verschiebliche Knoten als suspekt gelten sowie der Laboruntersuchung mit TSH, ggf. fT3, fT4 und Calcitonin, vornehmlich auf der Sonographie. Malignitätskriterien in der Sonographie sind unregelmäßige Begrenzungen, Echoarmut, verstärkte Gefäßversorgung, Gefäßinvasionen und Mikroverkalkungen. Jeder klinisch und/oder verdächtige solitäre Knoten, der ≥ 1 cm ist, sollte durch eine Feinnadelaspirationszytologie (FNAC) genauer untersucht werden. Diese Untersuchung ist der Goldstandard in der Differenzierung der Schilddrüsenerkrankungen, erweist sich jedoch schwierig bei Befunden follikulärer Läsionen. Da eine Unterscheidung zwischen Adenom und follikulärem Karzinom allein am Gewebeschnitt erkennbar ist, ein Karzinom zeigt eine Kapselinvasion, erfolgt bei diesem Befund häufig eine dia-

agnostische Operation. Eine Schilddrüsenszintigraphie sollte nur noch in Fällen von erniedrigtem oder nicht messbarem TSH durchgeführt werden, um so zwischen metabolisch aktiven bzw. inaktiven Knoten unterscheiden zu können. Das Spektrum der präoperativen Untersuchungen umfasst weiter die Computertomographie ohne Kontrastmittel, die Magnetresonanztomographie und auch die Positronenemissions-Tomographie, die allerdings nicht routinemäßig eingesetzt werden, sondern speziellen Fragestellungen vorbehalten sind (Pacini et al., 2006; Sherman, 2003).

1.2.4 Therapie

1.2.4.1 Differenzierte Schilddrüsenkarzinome

Die Standardtherapie der differenzierten Schilddrüsenkarzinome ist die radikale Thyreoidektomie mit Entfernung suspekter Lymphknoten meist des zentralen Kompartiments sowie einer nachfolgenden Radiojodtherapie. Für Karzinome mit einem Durchmesser ≤ 1 cm (T1a), die nur einen Lobus der Schilddrüse betreffen, wird eine ipsilaterale Hemithyreoidektomie ohne nachfolgende Radiojodtherapie empfohlen (Cooper et al., 2009). Die Radiojodtherapie ist nur möglich, da papilläre und follikuläre Karzinome der Schilddrüse am Jodstoffwechsel teilnehmen. Mit fortschreitender Dedifferenzierung hingegen besitzen Schilddrüsenkarzinome zumeist eine geringere Jodid-Aufnahmefähigkeit und weisen eine geringere Expression des Natrium-Jodid-Transporters auf, sodass eine Radiojodtherapie nicht zum gewünschten Erfolg führt (Caillou et al., 1998). Mit der postoperativen Radiojodtherapie werden folgende Ziele verfolgt: Ablation von verbliebenem Schilddrüsengewebe und möglichen bekannten und unbekannten mikroskopisch kleinen Tumorresiduen sowie Darstellung möglicher metastatischer Herde. Voraussetzung für die Radiojodtherapie ist ein erhöhter TSH-Spiegel > 30 mU/l, der etwa vier bis fünf Wochen postoperativ entweder durch Verzicht der Schilddrüsenhormonsubstitution und/oder durch Zufuhr von rekombinant hergestelltem TSH erreicht wird. Für die Nachbehandlung sollte eine lebenslange Suppressionstherapie mit Levothyroxin durchgeführt werden, um der zu erwartenden Hypothyreose vorzubeugen und das Risiko eines TSH stimulierten Tumorwachstums zu minimieren. Zusätzlich erfolgt in regelmäßigen Abständen eine körperliche Untersuchung, eine Sonographie des Halses und die Thyreoglobulinbestimmung (Pacini et al., 2006).

1.2.4.2 Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom

Aufgrund der meist infausten Prognose des anaplastischen Schilddrüsenkarzinoms erfolgt eine Therapie oftmals unter palliativen Gesichtspunkten durch ein multimodales Therapiekonzept. Sollte eine Operation möglich sein, ist die R0-Resektion anzustreben. Durch das lokal invasive Wachstum ist oftmals allerdings nur noch eine Verkleinerung des Tumors möglich. Anschließend sollte eine perkutane Strahlentherapie erfolgen, die in 40 % der Fälle initial zu einer Tumorverkleinerung führt. Die jedoch häufig auftretenden Lokalrezidive, trotz erfolgter Strahlentherapie, verdeutlichen die Strahlenresistenz des anaplastischen Karzinoms. Oft finden sich zusätzlich Resistenzen gegen Chemotherapien, dennoch kann durch Doxorubicin das initiale Ansprechen des undifferenzierten Karzinoms auf die Strahlentherapie auf 80 % gesteigert werden. Es ist allerdings anzumerken, dass diese Maßnahmen insgesamt lediglich dazu dienen, eine gewisse lokale Tumorkontrolle zu erreichen. Eine Verbesserung der Überlebensprognose besteht dadurch nicht. Oftmals sind das lokal destruierende Wachstum des anaplastischen Karzinoms in die Nachbarstrukturen und die Ausbildung von Fernmetastasen die Haupttodesursachen im Spätstadium (Ain, 1999; Sherman, 2003).

Wie zuvor dargestellt, gibt es bisher kein suffizientes Therapiekonzept für die Patienten mit anaplastischen Karzinomen. Die extrem schlechte Prognose erfordert umso stärker neue Therapiestrategien. Vielversprechend ist hier das Konzept der „*targeted therapy*“ in der Krebstherapie, das die zielgerichtete Behandlung durch monoklonale Antikörper, sowie aber auch durch *small molecules* zusammenfasst. Ein interessanter Angriffspunkt der *small molecules* ist hier die Inhibierung des Proteasoms durch Proteasominhibitoren wie Bortezomib.

1.3 Molekulare Aspekte

Mit dem Fortschreiten der Forschung und neuem Erkenntnisgewinn in der Pathogenese von Tumoren, besonders auf der molekularen Ebene, ist es möglich geworden neben der klassischen Chemotherapie andere Therapieoptionen in der Behandlung von Tumoren in Betracht zu ziehen und auf ihre Wirksamkeit hin zu testen.

Während eine Chemotherapie unspezifisch alle sich häufig teilenden Zellen betrifft,

sowohl die gesunden als auch die Tumorzellen, ist ein Ziel der neueren sogenannten *targeted therapy*, der zielgerichteten Therapie, speziell in die von Tumorzellen fehlgerichteten, molekularen Signalwege einzugreifen. Dadurch wird auch das Spektrum an Nebenwirkungen minimiert. Störungen im Ablauf der Zelldifferenzierung, -proliferation, und -motilität stellen grundsätzlich Ereignisse dar, die eine Krebsentstehung ermöglichen. Die zielgerichtete Therapie nutzt die Tatsache, dass sich in Tumorzellen häufig Mutationen bestimmter Gene (Onkogene) finden, die für eben diese Abläufe verantwortlich sind und versucht, einzelne dieser Vorgänge zu beeinflussen (Gibbs, 2000). Grundsätzlich stehen der zielgerichteten Therapie zwei Arzneistoffgruppen zur Verfügung: monoklonale Antikörper und niedermolekulare Substanzen (*small molecules*). Cetuximab, Trastuzumab, und Bevacizumab gehören zu der Gruppe der monoklonalen Antikörper und sind seit geraumer Zeit bereits klinisch im Einsatz und vor allem auf dem Gebiet der Tumorpheriferation und -neoangiogenese erfolgreich. Zu den niedermolekularen Substanzen zählt neben den Tyrosinkinaseinhibitoren auch die Gruppe der Proteasominhibitoren, die unter anderem Einfluss auf die oben genannten Abläufe, wie Zellwachstum, -teilung und -differenzierung nehmen und deshalb als *small molecules* im Rahmen der antitumoralen Therapie bereits eine entscheidende Rolle spielen. Zielstruktur dieser Inhibitoren ist das Proteasom bzw. das Ubiquitin-Proteasom-System, auf das im Folgenden genauer eingegangen werden soll (Einsele, 2010).

1.3.1 Allgemeine Funktion und Aufgabe des Proteasoms

Für die Homöostase und die Reaktion einer Zelle auf verschiedene Umwelteinflüsse, sind regulatorische Mechanismen notwendig, die die Biosynthese und den Abbau von Proteinen kontrollieren. In diesem Zusammenhang spielt das im Zytoplasma und im Nukleus von eukaryontischen Zellen vorkommende Proteasom eine entscheidende Rolle. In einer Zelle existieren circa 30.000 solcher Proteasomen, von denen das 26S Proteasom am Intensivsten studiert wurde. Es ist für die Degradation von etwa 80 % aller intrazellulären Proteine verantwortlich (Karp, 2005; Lodish et al., 2007). Zum einen schaltet es fehlgefaltete und mutierte Proteine, die funktionsunfähig sind, aus, zerlegt eingedrungene zellfremde virale Proteine und übernimmt zum anderen durch den kontrollierten Abbau funktionsfähiger Proteine, wie beispielsweise den zellzyklusregulie-

renden Cyclinen, bedeutende regulatorische Funktionen (Berg et al., 2011).

1.3.1.1 Architektur des Proteasoms

Das 26S Proteasom, ein multimerer 2,5 MDa großer Proteinkomplex, besteht aus einem hohlen fassförmigen katalytischen 20S Kernkomplex, dem an einen oder beiden Enden ein regulatorischer 19S Komplex wie eine Kappe aufsitzt (s. Abbildung 1) (Deutzmann, 2008). Der Kernkomplex setzt sich aus vier axial übereinander gelagerten Ringen, die jeweils aus sieben Untereinheiten bestehen, zusammen (Peters et al., 1994). Die äußeren Ringe, aus α -Untereinheiten 1-7 gebildet, dienen der Substraterkennung und bewirken durch Bildung eines engen Kanals, dass nur ungefaltete Proteine hineingelangen. Die beiden inneren, aus β -Untereinheiten 1-7 zusammengesetzten Ringe, übernehmen mit drei proteolytisch aktiven β -Untereinheiten, $\beta 1$ (Caspase ähnliche Aktivität), $\beta 2$ (Trypsin ähnliche Aktivität) und $\beta 5$ (Chymotrypsin ähnliche Aktivität) die katalytische Spaltung der Peptide in Bruchstücke von 3- 25 Aminosäuren (Bedford et al., 2010; Saeki & Tanaka, 2012). Anders als bei allen anderen Proteasen werden für alle proteolytischen Prozesse des 26S Proteasoms N-terminale Threonine der β -Untereinheiten als aktive Nukleophile benutzt. Das Proteasom stellt dementsprechend ein Threoninproteasom dar (Kisselev & Goldberg, 2001). Bei der $\beta 5$ -Untereinheit ist eine Hydroxylgruppe an der Seitenkette von Threonin (Thr1) verantwortlich für die katalytische Spaltung von Peptiden durch nukleophilen Angriff (Groll et al., 1999). Eine Inhibition eben dieser chymotrypsinartigen Aktivität der $\beta 5$ -Untereinheit zeigte signifikante Effekte auf die Protein-degradation des Proteasoms (Groll et al., 1999).

Der von den α -Untereinheiten gebildete Kanal ist normalerweise geschlossen und kann durch den 19S Komplex geöffnet werden (Köhler et al., 2001). Der 19S Komplex setzt sich aus zwei Subkomplexen zusammen, der Basis, aus 10 Proteinen bestehend von denen 6 ATPasen darstellen, und aus der aus 9 Proteinen zusammengesetzten Kappe (Zwickl, 1999).

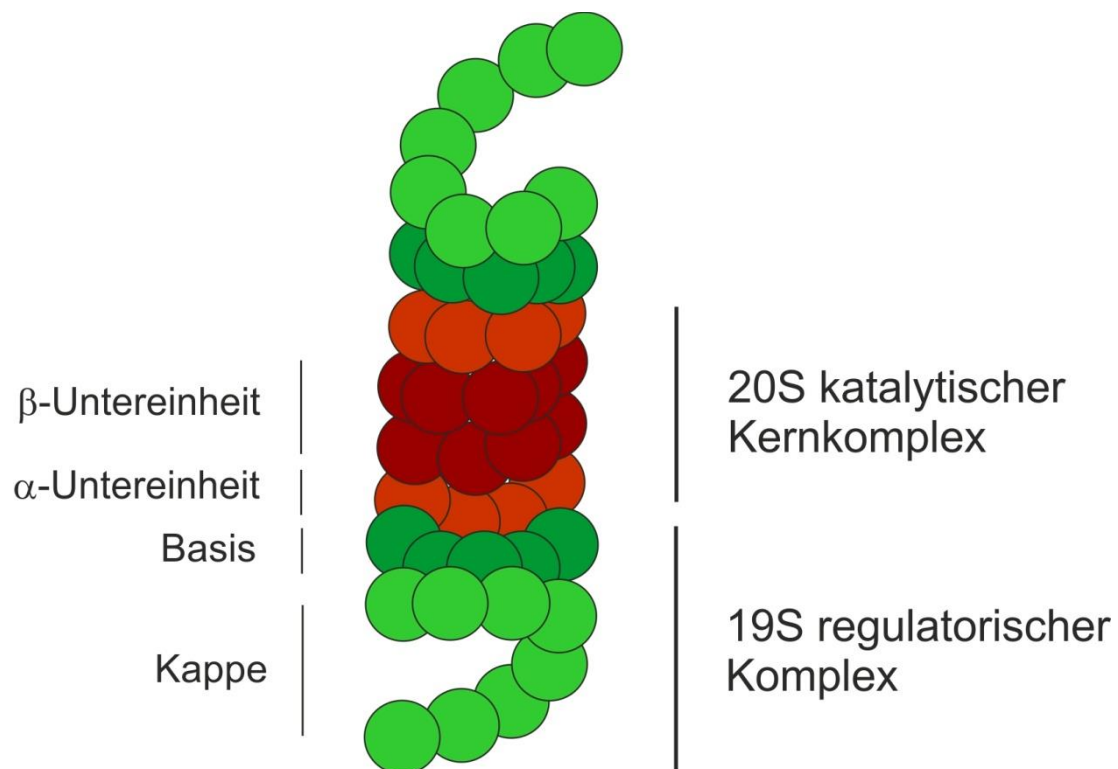


Abbildung 1: Architektur des 26S Proteasoms (modifiziert nach Naujokat & Hoffmann, 2002)

Die Basis sitzt den α -Einheiten des Kernkomplexes direkt auf und ermöglicht neben der Öffnung des Kanals, die Erkennung und Entfaltung der nativen Substratproteine, die degradiert werden sollen. Für den Prozess der Entfaltung wird die durch die ATPasen bereitgestellte Energie durch ATP-Hydrolyse genutzt (Smith et al., 2007). Die Kappe hingegen spaltet die Polyubiquitinketten (s. Abschnitt 1.3.1.2) der zu degradierenden Proteine in ihre monomeren Bestandteile, so dass diese als freie Ubiquitinproteine wieder zur Verfügung stehen (Goldberg, 2003).

1.3.1.2 Das Ubiquitinsystem

Damit Proteine, die degradiert werden sollen vom Proteasom als Substrate erkannt werden, benötigen diese eine entsprechende Markierung. Dies geschieht durch Anhängen einer Polyubiquitinkette und wird als Ubiquitinierung bezeichnet. Das Ubiquitin ist ein kleines, in eukaryonten Zellen evolutionär hoch konserviertes Protein mit 76 Aminosäuren (Pickart & Eddins, 2004). Der Prozess des Ubiquitinierens wird von

einem komplexen Enzymsystem unterstützt, das prinzipiell aus drei Enzymen besteht: dem Ubiquitin aktivierenden Enzym 1 (E1), dem Ubiquitin konjugierenden Enzym 2 (E2) und dem Substraterkennungsenzym oder auch Enzymligase (E3) (s. Abbildung 2). Das Enzym 1 erstellt unter ATP-Verbrauch eine energiereiche Thioesterbindung mit Ubiquitin zwischen der C-terminalen Carboxygruppe des Ubiquitins und einem Cystein des Enzyms 1. Das nun mit Energie angereicherte Ubiquitin wird durch eine erneute Thioesterbindung an Enzym 2 übertragen, welches im Folgenden einen Komplex mit Enzym 3 bildet, welches für die spezifische Substraterkennung verantwortlich ist. Somit stellt Enzym 3 eine Verbindung zwischen Enzym 2 und dem Substrat her, unter der Enzym 2 nun das Ubiquitin mit diesem verbinden kann. Das Ubiquitin am Substrat dient als Akzeptor an den weitere Ubiquitine hinzugefügt werden können, bis eine Polyubiquitinkette existiert, die aus mindestens vier Ubiquitinmonomeren bestehen muss, damit das Proteasom sein Substrat erkennen kann (Hershko & Ciechanover, 1998; Willis et al., 2010). Durch das Vorkommen mehrerer Vertreter einer Enzymklasse, rund 50 Enzyme 1 und 2 und 500-700 Enzyme 3, ist eine spezifische Substraterkennung gewährleistet.

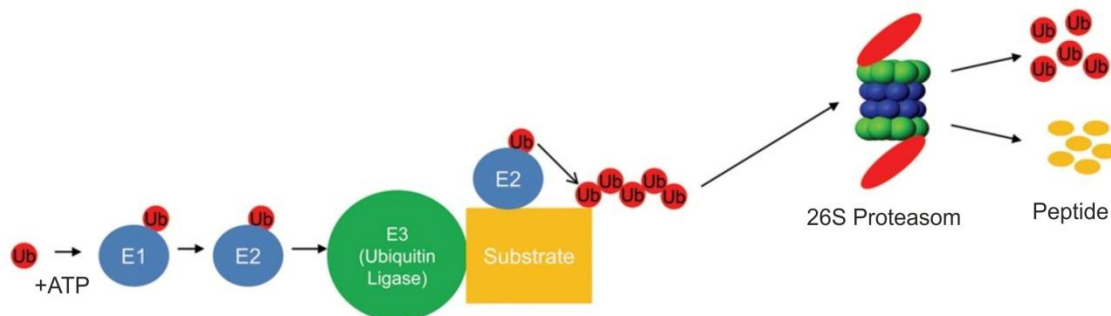


Abbildung 2: Das Ubiquitin-Proteasom-System (aus Willis et al., 2010)

1.3.2 Proteasominhibitoren als antineoplastische Therapeutika

Proteasominhibitoren fanden zunächst Verwendung in der Grundlagenforschung, um genauere Erkenntnisse über die katalytischen Zentren des Proteasoms und das Ubiquitinsystem zu erhalten (Kisselev & Goldberg, 2001; Rivett, 1989). 2003 wurde Bortezomib als erste Substanz dieser neuen Pharmakaklasse von der US Food and Drug Administration (FDA) zugelassen (s. <http://www.fda.gov>). Durch die bereits aufgezeigte essentielle Bedeutung des Proteasoms für das Überleben und geordnete Funktionieren

einer Zelle könnten Zweifel auftreten, dass Proteasominhibitoren überhaupt therapeutisch genutzt werden können. Es zeigte sich jedoch in der Praxis, dass entartete Zellen empfänglicher für die durch Proteasominhibition induzierten proapoptotischen Effekte sind. So reagierten zum Beispiel ras/c-myc-transformierte Fibroblasten und c-myc-transformierte Lymphoblasten bis zu 40 mal sensibler auf die Proteasominhibition als normale Fibroblasten und Lymphoblasten (Drexler, 1997; Orlowski et al., 1998). Maligne Plasmazellen von Patienten mit einem Plasmozytom reagierten 20-40 fach sensitiver auf durch den Proteasomhemmer Bortezomib induzierte Apoptose als mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (Hideshima et al., 2001). Dies könnte durch den erhöhten Umsatz von Proteinen in malignen Zellen zu erklären sein (Chauhan et al., 2005; Kisselev & Goldberg, 2001). Sie proliferieren schneller, es kommt zu einer vermehrten Akkumulation fehlerhafter Proteine, die dann proteasomabhängig abgebaut werden (Adams, 2004a). Zudem erwies sich in präklinischen Studien, dass sich die Wirkung klassischer Chemotherapeutika auf maligne Zellen, wie z.B. kolorektale Karzinomzellen, unter der Behandlung von Proteasominhibitoren verstärkt (Cusack et al., 2001; Hideshima et al., 2001). Ebenso zeigte sich, dass maligne Zellen, die zuvor gegen Radio- oder Chemotherapie resistent waren, durch Proteasominhibitoren resensibilisiert werden konnten (Voorhees et al., 2003). Dies konnte unter anderem an Zelllinien von Brust- und Lungentumoren in Kombination mit 5-Fluoruracil (Teicher et al., 1999) gezeigt werden. Eine wichtige Rolle scheint dabei der Inhibition des Transkriptionsfaktors NF κ B zuzukommen. Unter der Behandlung vieler Chemotherapeutika wird dieser verstärkt gebildet und induziert die Expression antiapoptotischer sowie proinflammatorischer Gene (Dong et al., 2002; Zong et al., 1999), die letztendlich eine Apoptose der Zelle verhindern. Ebenso wurden erhöhte Proteasomaktivitätslevel in malignen Zellen festgestellt. So wurde z.B. in CLL-Zellen eine dreifach höhere Proteasomaktivität eruiert als bei normalen Lymphozyten (Masdehors et al., 2000). Die aufgezeigten Aspekte verdeutlichen, dass das Proteasom eine wichtige Funktion in der Tumorgenese einnimmt und deshalb ein interessantes Ziel für die Tumorthherapie darstellt.

Proteasominhibitoren können nach folgenden physikochemischen Eigenschaften eingeordnet werden (nach Groll et al. 2004; Kisselev et al. 2001): der *Herkunft*, dem *strukturellen* Aufbau, der *Bindungsart* am katalytischen Zentrum des Proteasoms, der *Reversibilität und Spezifität* für das Proteasom sowie der *Affinität* zu den einzelnen

katalytischen Untereinheiten. Derzeit wird intensiv an der Entwicklung und Erforschung weiterer Proteasominhibitoren gearbeitet, die nach den oben genannten Kriterien variieren. Es wird versucht das Spektrum der Einsatzfähigkeit von Proteasominhibitoren zu erweitern, einen spezifischeren antitumoralen Effekt zu erzielen sowie Nebenwirkungen und Resistenzentwicklungen zu minimieren (Mujtaba & Dou, 2011). Dies wird durch die aktuell 646 offenen und geschlossenen klinischen Phase I-III Studien unterstrichen, die derzeit die Wirkung von Proteasominhibitoren an verschiedenen Tumor-entitäten untersuchen (siehe: <http://www.clinicaltrials.gov>).

1.3.3 Bortezomib PS-341 (Velcade[®])

Der Proteasominhibitor Bortezomib lässt sich gut nach den unter dem Abschnitt *Proteasominhibitoren als antineoplastische Therapeutika* aufgeführten Kriterien klassifizieren und dadurch einleitend vorstellen. Bortezomib ist ein synthetischer, kein natürlich vorkommender Dipeptidylborsäure-Wirkstoff (*N*-pyrazincarbonyl-*L*-phenylalanin-*L*-leucin Borsäure) (Adams, 2004b) (*struktureller Aufbau*) (s. Abbildung 3), der spezifisch und langsam reversibel (*Spezifität, Reversibilität*) hauptsächlich die $\beta 5$ -Untereinheit mit der Chymotrypsin ähnlichen Aktivität des 20S Proteasoms inhibiert (*Affinität*) (Papandreou et al., 2004). Der Borsäureteil von Bortezomib geht eine (pseudo-) kovalente Bindung hauptsächlich mit der nukleophilen Seitenkette von Thr1 in der S1 Tasche der $\beta 5$ -Untereinheit ein (*Bindungsart*) und gewährleistet dadurch eine potentere und selektivere Proteasom-Inhibition als frühere Generationen der synthetisch hergestellten Proteasominhibitoren. Zu letzteren gehören die Peptid-Aldehyde (Groll et al., 2006) von deren molekularem Aufbau ausgehend die Borsäure Derivate, wie Bortezomib, entwickelt wurden (Iqbal et al., 1996).

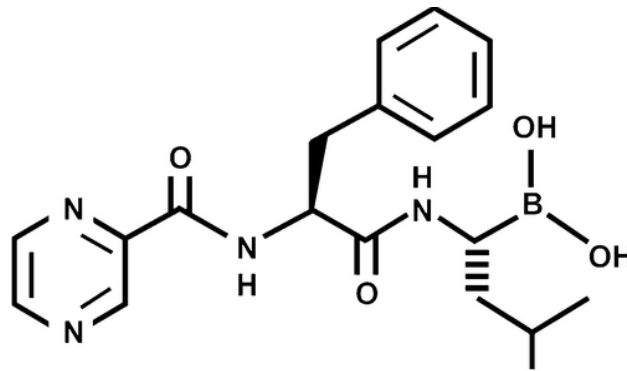


Abbildung 3: chemische Struktur von Bortezomib (aus Richardson et al., 2006)

Aus dreizehn borhaltigen Verbindungen, die im National Cancer Institute (NCI) bei 60 Zelllinien auf antitumorale Aktivität getestet wurden, zeigte PS-341, heute Bortezomib genannt, die größte antitumorale Wirksamkeit auf viele Tumorzelllinien sowie ein einzigartiges zytotoxisches Profil verglichen mit 60.000 Verbindungen aus dem NCI-Archiv (Adams et al., 1999). Dies war der Grund warum gerade Bortezomib besondere Aufmerksamkeit bekam und weiter intensiv untersucht wurde (Adams, 2004b).

Am 13. März 2003 wurde es von der U.S. Food and Drug Administration (FDA) in einem Eilverfahren, nach vorzeitigem Abbruch einer Phase-III-Studie, zugelassen, da die klinischen Daten von Patienten mit anbehandeltem fortgeschrittenem Multiplen Myelom bezüglich Krankheitsprogression, Therapieerfolg und Überleben eine eindeutige Verbesserung gegenüber der bis dahin durchgeführten Dexamethason Therapie zeigten. Mit einer Zeitspanne von viereinhalb Jahren von der Phase-I-Studie bis zu der Zulassung ist es eines der schnellsten Zulassungsverfahren eines antitumoralen Wirkstoffs.

Auch wenn der genaue Wirkmechanismus von Bortezomib noch nicht bis in das Detail verstanden ist (Mujtaba & Dou, 2011), konnten einige präklinische Studien mögliche antitumorale Wirkmechanismen dieser Substanz aufzeigen.

Verschiedene Untersuchungen an unterschiedlichen Tumorzelllinien wie z.B. des Multiplen Myeloms, kolorektalen Karzinoms, Plattenepithelkarzinoms und der T-Zell Leukämie zeigten, dass Bortezomib eine Aktivierung von NFκB (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) verhindert (Hideshima et al., 2002; Ma et al., 2003; Russo et al., 2001; Sunwoo et al., 2001; Tan & Waldmann, 2002). Bei NFκB handelt es sich um einen heterodimeren Transkriptionsfaktor, der eine wichtige Funktion im Überleben einer Zelle einnimmt und sie in Stresssituationen, wie z.B. durch

therapeutische Bestrahlung und Chemotherapeutika hervorgerufen, vor Apoptose schützt. NFκB ist im Zytosol an IκBa (inhibitorische κB-Proteine) gebunden und transloziert erst nach Ubiquitinierung, Degradierung und Phosphorylierung von IκBa durch den Ubiquitin-Proteasom-Signalweg in den Zellkern (Karin et al., 2004). Somit üben inhibitorische κB-Proteine im Zusammenspiel mit dem Ubiquitin-Proteasom-Signalweg eine regulierende Funktion über den Aktivitätsgrad von NFκB aus. Durch Bortezomib wird die proteasomale Aktivität inhibiert, sodass die IκBa nicht degradiert und dadurch nicht von NFκB freigesetzt werden. NFκB bleibt folglich inaktiv (Cusack et al., 2001). Im Zellkern reguliert NFκB die Transkription von Genen, die in die Apoptose eingreifen, wie z.B. von Bcl-2, Bcl-x und den *Inhibitor of apoptosis proteins (IAP)*, den Zellzyklus, die Entzündung, wie z.B. von Il-6 und Il-8 und die durch den *vascular endothelial growth factor (VEGF)* regulierte Angiogenese, (Mitsiades et al., 2002) (s. Abbildung 4). Einige Tumorzellen weisen erhöhte Aktivitätslevel von NFκB auf, (Dong et al., 2002; Loercher et al., 2004) wie speziell bei Patienten mit refraktärem Multiplen Myelom gezeigt werden konnte (Feinman et al., 1999). Zusätzlich zeigten Bortezomib sensitive Myelomzellen höhere Aktivitätslevel von NFκB als nicht sensitive (Ma et al., 2003). Dies konnte auch an Schilddrüsenkarzinomzelllinien beobachtet werden sowie ebenfalls eine Unterdrückung der NFκB Aktivität durch Bortezomib (Mitsiades et al., 2006).

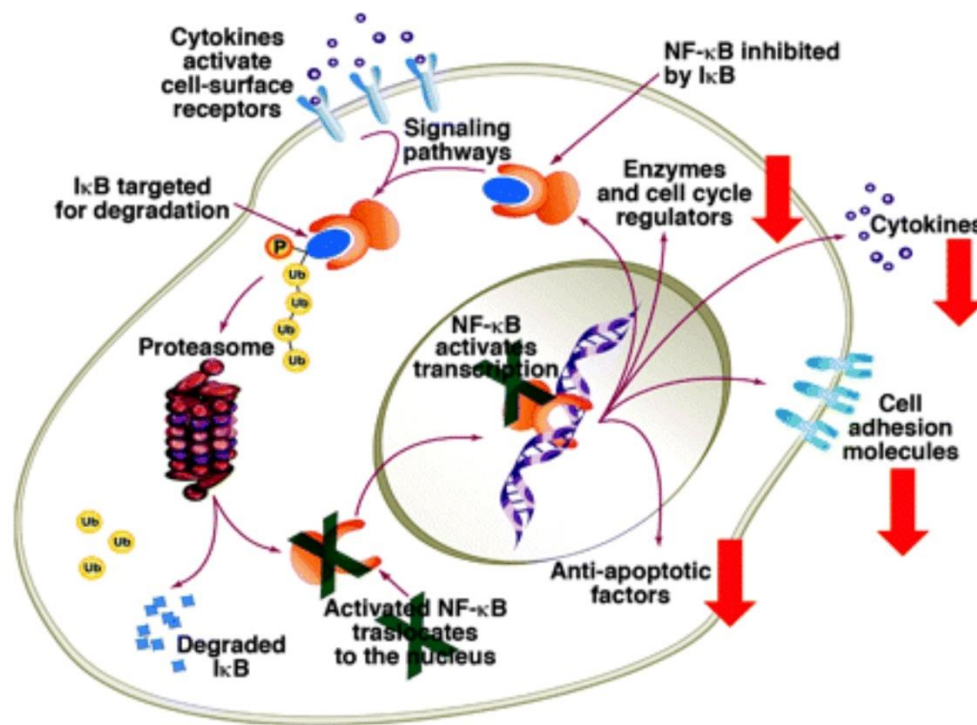


Abbildung 4: Auswirkungen der Proteasominhibition durch Bortezomib auf NFκB und deren Auswirkung auf regulatorisch wichtige Proteine (aus Armand et al., 2007)

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass dem Transkriptionsfaktor NFκB eine entscheidende Rolle in der Tumorgenese und auch -therapie zukommt.

Zusammenfassend verhindert Bortezomib die proteasomale Degradierung von IκB, dadurch eine Aktivierung von NFκB (s. Abbildung 4) und dessen antiapoptotischer Effekte. Zugleich bewirkt es eine erhöhte Sensitivität der Zellen für therapeutische Bestrahlungen, Chemotherapeutika oder Immuntherapien (Cusack et al., 2001; Hideshima et al., 2001). Die vollständige Wirkung Bortezomibs lässt sich allerdings nicht einzig durch eine Inhibition von NFκB erklären, wie mittels PS-1145, einem spezifischem NFκB-Inhibitor, gezeigt werden konnte, der nur partiell die Zellproliferation von Tumorzellen verhinderte (Hideshima et al., 2002).

Ebenso werden zahlreiche andere Proteine durch Bortezomib beeinflusst, die die Transkription, Apoptose und Proliferation beeinflussen.

Im Folgenden sollen nun einige Aspekte des Wirkmechanismus von Bortezomib genauer betrachtet werden (s. Abbildung 5):

- Induktion von Endoplasmatischem Retikulum-Stress (ER-Stress)
- Änderung des mitochondrialen Membranpotentials und Produktion der *reactive oxygen species*
- Expression der C-Jun-terminalen NH2 Kinase
- Aktivierung des extrinsischen Apoptosewegs z.B. durch Bid und Caspase-8
- Induktion des intrinsischen Apoptosewegs, z.B. durch Cytochrom c Freisetzung und folgender Aktivierung der Caspase-9 und Caspase-3-Kaskade
- Beeinflussung des Tumorsuppressorgens p53

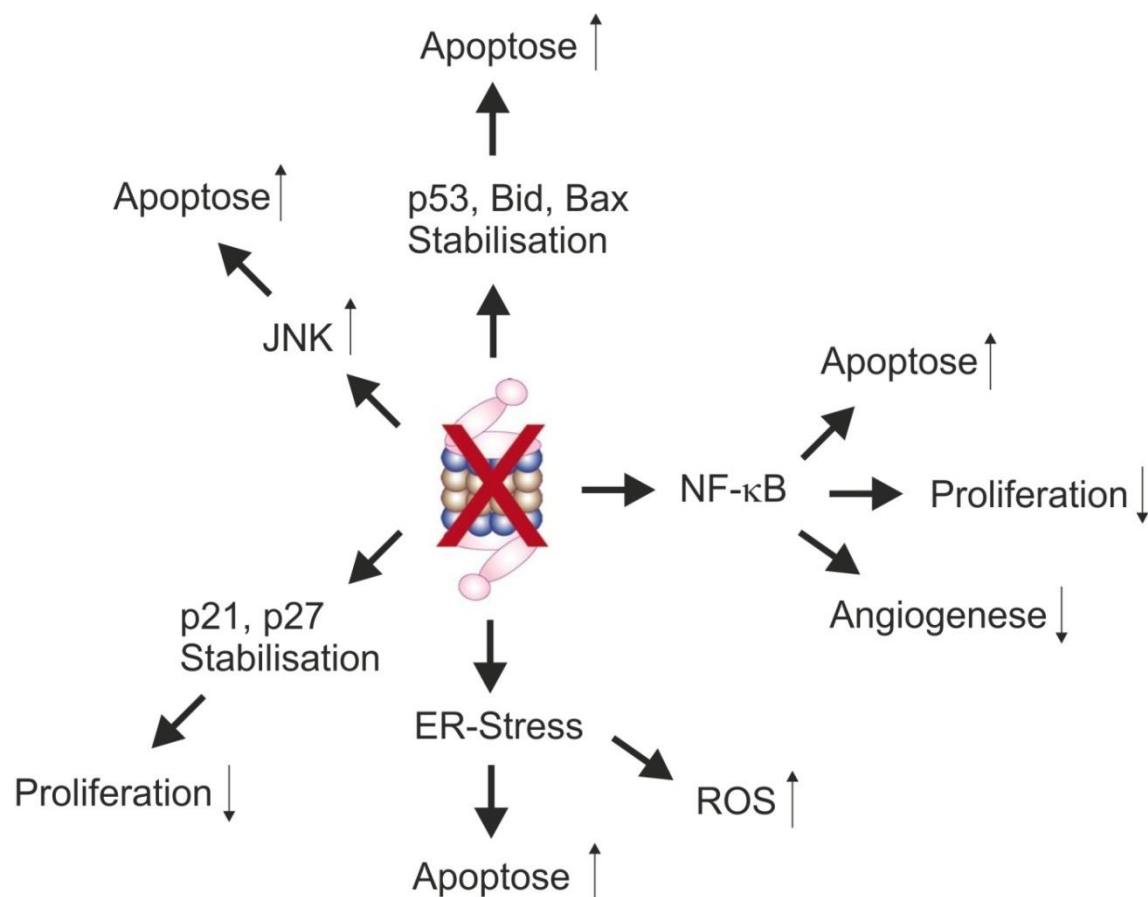


Abbildung 5: Synopsis der Proteasominhibition durch Bortezomib und deren Effekte (modifiziert nach Boccadoro et al., 2005)

Unter Bortezomib wurde die Induktion einer Stressreaktion des Endoplasmatischen Retikulums beobachtet, die zu einer Freisetzung von Calcium führt, welches dann vom Mitochondrium aufgenommen wird und eine Cytochrom c Freisetzung induziert. Dadurch wiederum werden Effektorcaspasen aktiviert, was letztendlich zur Apoptose führt

(Landowski et al., 2005).

Weiter wurde unter Bortezomib eine Induktion der *reactive oxygen species (ROS)* gefunden, die in verschiedene zelluläre Signalwege einschließlich der Apoptose involviert sind (Fleury et al., 2002). Die vermehrte Produktion von ROS in diversen Tumorzelllinien wird mittlerweile als ein frühes, kritisches Ereignis in der Apoptoseinduktion durch Bortezomib gesehen (Fribley et al., 2004; Ling et al., 2003; Pérez-Galán et al., 2006). Der genaue Mechanismus, der zu einem Anstieg der ROS führt ist noch nicht bekannt. Eine Erklärung könnte der zuvor beschriebene durch Bortezomib induzierte ER-Stress sein (Pérez-Galán et al., 2006). Dieser Weg der Apoptoseinduktion, durch Produktion von ROS, konnte auch für die anaplastische Schilddrüsenzelllinie FRO beobachtet werden. Darüberhinaus scheint die Sensitivität von Schilddrüsenzelllinien auf Bortezomib von dem Vermögen Glutathion (GSH) zu produzieren abhängig zu sein. Glutathion ist ein Antioxidans, das die ROS abfangen und dadurch deren apoptotische Wirkung reduzieren kann (Du et al., 2009).

Ebenso wird durch den Zusammenbruch des inneren Mitochondriummembranpotentials der mitochondriale Apoptoseweg durch Bortezomib induziert (Ling et al., 2003; Pérez-Galán et al., 2006).

Die C-Jun-terminale-Kinase (JNK) ist ein Protein, das als Reaktion auf Zellstress und einer ansteigenden Anzahl von fehlgefalteten Proteinen die Apoptose begünstigt. Dies erfolgt zum einen durch Inaktivierung des antiapoptotischen Bcl-2 mittels Phosphorylierung sowie Aktivierung des proapoptotischen Bax mit folgender Cytochrom c Aktivierung (Gabai et al., 1998; Tsuruta et al., 2004) und zum anderen über die JNK-c-Jun-AP-1-Achse. Bortezomib stabilisiert die JNK, steigert die c-Jun Phosphorylierung und die DNA Bindungskapazität des Transkriptionsfaktors AP-1, was zu einer Steigerung der Fas-Expression und konsekutiv zur Apoptose führt (Mitsiades, et al., 2002). In Multiplen Myelom- und nichtkleinzelligen Lungenzellkarzinomzellen führte die Bortezomibbehandlung zu einer Aktivierung von JNK (Chauhan et al., 2004; Hideshima et al., 2003; Yang et al., 2004). Dies konnte auch für die anaplastische Schilddrüsenzelllinie FRO beobachtet werden (Mitsiades et al., 2006).

Es zeigte sich außerdem in medullären und anaplastischen Schilddrüsenzelllinien, dass eine Überexpression von Bcl-2 die Wirkung von Bortezomib reduziert (Mitsiades et al., 2007). Dementsprechend konnte beobachtet werden, dass die anaplastische Schilddrüsenzelllinie FRO sensitiver auf die Apoptoseinduktion durch Bortezomib bei gleichzei-

tiger Behandlung mit BH3-domain-Inhibitor (BH3I-1) reagierte. BH3I-1 unterdrückt den antiapoptotischen Mechanismus einiger Mitglieder der antiapoptotischen Bcl-2 Familie.

Unter Bortezomib kommt es außerdem zu einer Spaltung von Caspase-8 und dadurch unter anderem zur Einleitung des extrinsischen Apoptosewegs (Mitsiades et al., 2002). Eine Spaltung der Initiatorcaspase-8 und -9 mit folgender Beeinflussung der Effektorcaspase-3 und -2 konnte auch in der Schilddrüsenzelllinie TT, abgeleitet von einem medullären Schilddrüsenkarzinom, beobachtet werden (Mitsiades et al., 2006).

Weiter führt Bortezomib zu einer Stabilisierung und Akkumulation der proapoptotischen Proteine Bid und Bax (Breitschopf et al., 2000; Li & Dou, 2000) sowie des Tumorsuppressors p53 (Adams, 2004a, 2004b), der sich als Transkriptionsfaktor bei DNA-Schäden anreichert, einen Stopp des Zellzyklus durch die Produktion von p21 bewirkt und bei erfolgloser Reparatur und weiterer Anreicherung die Apoptose mittels Aktivierung von Genen der Bcl-2-Familie einleitet (Hock et al., 2011). Eine Akkumulation von p53 sowie auch p21 konnte ebenso in der medullären Schilddrüsenkarzinomzelllinie TT sowie der anaplastischen Schilddrüsenkarzinomzelllinie FRO gefunden werden (Mitsiades et al., 2006). Bei Brust- und Lungenkrebszelllinien zeigte sich in vitro eine Korrelation zwischen dem Status von p53 und der Sensitivität gegenüber Bortezomib (Ling et al., 2003; MacLaren et al., 2001), bei Prostata- (Adams et al., 1999) Multiplem Myelom- (Hideshima et al., 2001) und Kolonkarzinomzelllinien (Cusack et al., 2001) hingegen zeigte sich dieser Zusammenhang nicht.

Ein weiterer wichtiger antitumoraler Wirkmechanismus Bortezomibs scheint in der Expression des proapoptotischen Proteins NOXA, zur Bcl-2 Familie zählend, zu liegen, welches durch p53 aktiviert wird und letztendlich zu einer Caspase-9-Aktivität führt (Oda et al., 2000). Gleichzeitig konnte aufgezeigt werden, dass Bortezomib p53 unabhängig ebenfalls eine Expression von NOXA induziert und dadurch einem weiteren Tumorwachstum entgegenwirkt (Adams, 2004a; Caravita et al., 2006; Nikiforov et al., 2007).

Die Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren p21^{WAF1} und p27^{KIP}, zur cdc25-Proteinfamilie zählend, die durch Bindung an CDK-Komplexe (*cyclin dependent Kinase*) ein Arrest des Zellzyklus in der G1-S-Phase auslösen, erfahren ebenfalls eine Stabilisierung durch Bortezomib (Hideshima et al., 2001; Shah et al., 2001; Yang et al., 2004).

Auch konnte in Multiplen Myelomzelllinien gezeigt werden, dass durch Bortezomib die

Phosphorylierung von Caveolin-1, einem Protein, das für die Zellmotilität und -migration verantwortlich ist, durch VEGF (*vascular endothelial growth factor*) verhindert wird (Podar et al., 2004). VEGF ist ein proangiogenes Zytokin, welches ein Zielgen des Transkriptionsfaktors NFκB darstellt (Bancroft et al., 2001) und dessen Sekretion ebenfalls durch Bortezomib unterbunden wird.

In androgenabhängigen und androgenunabhängigen Prostatazelllinien wurde beobachtet, dass Bortezomib die Synthese von HIF-1α (Hypoxie induzierter Faktor) über den PI3K/Akt/mTOR und MAPK Weg reduziert. HIF-1α ist ein Faktor, der das Tumorstadium unterstützt, der am besten untersucht ist und ein vielversprechendes Ziel der antitumoralen Therapie darstellt (Befani et al., 2012).

In einer Reihe anaplastischer Schilddrüsenkarzinomzelllinien wurde gezeigt, dass das Niveau an *Glucose-regulated Protein 78kDa* (GRP78) und *CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein* (CHOP) die Sensitivität der anaplastischen Schilddrüsenzelllinien auf Bortezomib beeinflusst, so dass eine Unterdrückung der CHOP-Induktion und eine Überexprimierung von GRP78 den durch Bortezomib induzierten Zelltod zum Teil verhindert (Wang et al., 2007).

An der anaplastischen Schilddrüsenkarzinomzelllinie (MB1), die aus dem anaplastischen Schilddrüsenkarzinom eines Patienten etabliert wurde, konnte in einem experimentellen Setting gezeigt werden, dass sie auf Bortezomib als *second-line* Therapie reagierte. Bortezomib wurde dem Patienten verabreicht, gut vertragen und führte zu einer Nekrose der refraktären Tumormasse, was durch bildgebende Verfahren und Feinnadelpunktion verifiziert wurde (Stenner et al., 2008).

1.3.4 Bortezomib und klinische Studien

Bortezomib ist heute sowohl alleine als auch in Kombination mit anderen Chemotherapeutika als Ersttherapie für das neu diagnostizierte, refraktäre und rezidivierende Multiple Myelom sowie als Therapie des Mantelzelllymphoms nach vorheriger Gabe und Versagen anderer Wirkstoffe zugelassen (Mateos et al., 2010). Es konnte zunächst gezeigt werden, dass Bortezomib große Aktivität in Multiplen Myelomzelllinien besitzt. So sprachen in einer Phase-I-Studie alle Patienten mit Multiplem Myelom (MM) auf Bortezomib bis hin zu einer kompletten Remission an (CR) (Orlowski et al., 2002).

Nach diesem positiven Ergebnis folgten weitere Studien, die die Wirksamkeit von Bortezomib hinsichtlich des Multiplen Myeloms untersuchen sollten.

In der SUMMIT-Studie (Phase-II) wurden 202 Patienten mit refraktärem und rezidivierendem Multiplem Myelom mit Bortezomib als Monotherapie behandelt. 35 % der Patienten erreichten eine komplette (CR), teilweise (PR) oder geringe (MR) Reduktion. Die Ergebnisse dieser Studie führten schließlich zu der Zulassung von Bortezomib bei fortgeschrittenem Multiplen Myelom (Richardson et al., 2003a).

In der darauffolgenden CREST-Studie bei therapierefraktären oder rezidivierenden MM-Patienten konnte durch eine Kombination mit Dexamethason der Therapieerfolg weiter gesteigert werden (Jagannath et al., 2004).

Die aktuellste Phase III-Studie VISTA (Velcade as Initial Standard Therapy in Multiple Myeloma) zeigte bei Patienten mit neu diagnostiziertem symptomatischem MM, die keiner Hochdosischemotherapie zugeführt werden konnten, eine Verbesserung der allgemeinen Überlebenszeit bei der Behandlung mit Bortezomib, Melphalan und Prednisolon gegenüber Prednisolon und Melphalan alleine (Miguel et al., 2008). Eine Analyse dieser Daten ergab, dass die allgemeine Überlebenszeit bei Kombination von herkömmlichen Chemotherapeutika mit Bortezomib als Wirkstoff in der Ersttherapie (*first-line-therapy*) einen größeren Überlebensvorteil gegenüber konventionellen Therapeutika bewirkte, die Bortezomib erst später zur Heilung einsetzten. Außerdem konnte bei 79 % der Patienten ein Rückgang der peripheren Neuropathie beobachtet werden, die bei Patienten unter Bortezomib, Melphalan und Prednison-Behandlung auftrat, was eine Reversibilität dieser Nebenwirkung aufzeigt (Mateos et al., 2010). Weitere klinische Studien untersuchten bei Patienten mit neu diagnostizierten MM die Wirkung von Bortezomib in Kombination mit anderen Wirkstoffen wie Melphalan, Prednisolon und Thalidomid oder Dexamethason, Cyclophosphamid und Lenalidomid (Kumar et al., 2010; Palumbo et al., 2010). Dies spiegelt den Trend der klinischen Versuche bei neudiagnostizierten MM-Patienten wider, Wirkstoffe von denen bekannt ist, dass sie gegen das MM wirksam sind mit Bortezomib zu kombinieren, um die Ansprechrates zu erhöhen (Ruschak et al., 2011).

Neben hämatologischen Erkrankungen wurde Bortezomib in verschiedenen Phase-I- und II-Studien auch für solide Tumoren getestet. In einer Phase-I-Studie, die bei 15 Patientinnen mit rezidiviertem oder progredientem Ovarialkarzinom durchgeführt wurde, sprachen 47 % auf die Behandlung von Bortezomib in Kombination mit Carboplatin

an. Zwei zeigten eine komplette Remission, wobei eine Patientin sogar eine platin-resistente Erkrankung aufwies und fünf eine teilweise Remission (Aghajanian et al., 2005).

Eine partielle Remission wurde ebenso in 38 % bei einer weiteren Phase-I-Studie, die 34 Patienten hauptsächlich mit Nichtkleinzelligem Lungenkarzinom einschloss, mit der Behandlung von Bortezomib, Gemcitabine und Carboplatin erreicht (Voortman et al., 2007).

Bei soliden Tumoren zeigten Monotherapien mit Bortezomib weniger vielversprechende Effekte, wie z.B. Phase-II-Studien bei metastasiertem Mammakarzinom, malignem Melanom und Karzinoiden zeigten (Markovic et al., 2005; Shah et al., 2004; Yang et al., 2006).

Eine offene Phase-II-Studie untersucht zurzeit noch die Wirkung von Bortezomib bei Patienten mit metastasiertem papillärem und follikulärem Schilddrüsenkarzinom, die primär nicht auf eine Radiojodtherapie ansprachen (NCT00104871 <http://www.clinicaltrials.gov>).

Trotz der bisher bewiesenen Effektivität von Bortezomib verglichen mit herkömmlichen Chemotherapeutika, ist zu beachten, dass Bortezomib ein sehr enges therapeutisches Fenster besitzt. Die therapeutische Dosis beträgt $1,3 \text{ mg/m}^2$, wohingegen eine Dosis von $1,5 \text{ mg/m}^2$ dosislimitierende toxische Effekte in Phase-I-Studien hervorrief (Cortes et al., 2004). Die am häufigsten beobachteten Nebenwirkungen in Assoziation mit Bortezomib sind gastrointestinale Symptome, Anämie, Thrombozytopenie, Kraftlosigkeit mit Erschöpfung, Unwohlsein und Schwäche, erhöhte Calciumwerte und periphere Neuropathie (Orlowski et al., 2005). Ebenso ist anzumerken, dass bei manchen Patienten eine Resistenzentwicklung gegen Bortezomib zu beobachten ist. Die durchschnittliche Zeit vom Start der Bortezomibbehandlung bis zum Auftreten der Resistenz liegt bei ungefähr einem Jahr (Richardson et al., 2003a). Als Erklärung für die Entwicklung von Resistenzen gegen Bortezomib konnten bisher unter anderem Mutationen in der Bortezomib-Bindungstasche der $\beta 5$ -Untereinheit gefunden werden (Oerlemans et al., 2008) sowie eine Überexpression der proteasomalen $\beta 5$ -Untereinheit, eine Überexpression des antiapoptotischen bcl-2 Proteins (Smith et al., 2011) und eine Überexpression der Hitzeschockproteine (HSP) 27, 70 und 90 (Shringarpure et al., 2006).

1.4 Fragestellung und Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die systematische in vitro Analyse antitumoraler Effekte des Proteasominhibitors Bortezomib auf fünf verschiedene Zelllinien von Schilddrüsenkarzinomen, wobei der Reaktion der anaplastischen Zelllinien auf Bortezomib besonderes Interesse galt.

Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

- Beeinflusst Bortezomib die Zellviabilität der einzelnen Zelllinien?
- Kann unter Bortezomib eine Aktivitätssteigerung von Caspase-3 ausgemacht werden? Steht diese in einem Zusammenhang mit der Inhibition der NFκB-Aktivität?
- Welche weiteren apoptoseregulierenden Faktoren, außer Caspase-3, werden durch Bortezomib beeinflusst?
- Induziert Bortezomib einen G2/M-Arrest?
- Führt Bortezomib zu einer Verminderung der NFκB-Aktivität? Besteht ein Zusammenhang zwischen der Aktivität des Transkriptionsfaktors NFκB und den von Bortezomib erzeugten Effekten auf die Zellviabilität? Kommt dementsprechend NFκB als ein möglicher Faktor der Apoptoseinduktion in Betracht?
- Besteht ein Zusammenhang zwischen dem Level der Expression von CHOP und GRP78 und der Sensitivität gegenüber Bortezomib?
- Sind Wirksamkeitsunterschiede von Bortezomib auf die verschiedenen zellulären Histiotypen (papillär, follikulär und anaplastisch) auszumachen?

Die vorliegende Studie soll einen weiteren Einblick in die Wirkungsmechanismen von Bortezomib gegenüber Schilddrüsenkarzinomzelllinien liefern und eine Voraussetzung schaffen, die gefundenen Ergebnisse in einem in vivo Modell weiter zu studieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Zellen

In dieser Arbeit wurden etablierte humane Schilddrüsenkarzinomzelllinien unterschiedlicher Differenzierungsgrade untersucht. Für die anaplastischen, undifferenzierten Schilddrüsenkarzinome wurden die Zelllinien Hth74, der aggressivere Subklon C643 (Heldin N.E. Cvejic, Smeds S, Westermakr B. 1991) sowie Kat 4.1 (Ain KB, Tofiq S, Taylor KD) verwendet. Für die follikulären Karzinome wurde die Zelllinie FTC133 (Hoelting T. Zielke A, Siperstein AE, Clark OH, DUh QY, 1994) und für die papillären Karzinome die Zelllinie TPC1 (Ishizaka Y. et al., 1990) genutzt. Die Zellen wurden in der eigenen Tumorzellbank aufbewahrt und bis zur Kultivierung in flüssigem Stickstoff bei -196° C kryokonserviert.

Die weitere Materialliste befindet sich im Anhang (s. Abschnitt 7.1)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Kultivierung und Passagierung

Alle Zellkulturarbeiten fanden unter sterilen Bedingungen in einer Sterilbank, Hera Safe, Typ HS12, statt. Die verwendeten Zelllinien wurden in FGM (DMEM/ HAM'S F-12 (1:1), w/o L-Glutamine mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin) bei 37° C, 5 % CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre in einem Zellinkubator, Heraeus, Typ B5601 EK-CO₂, kultiviert. Durch das fötale Kälberserum erhalten die Zellen wichtige Hormone, Bindungs- und Anheftungsfaktoren (Fibronektin) sowie Wachstumsfaktoren (Lindl et Bauer, 1989). Der Zusatz von 1 % Penicillin/Streptomycin beugt einer bakteriellen Kontamination vor.

Zum Passagieren wurde das verbrauchte Nährmedium aus den Zellkulturflaschen abgesaugt und die Zellen anschließend mit 10 ml PBS, ohne Mg²⁺/Ca²⁺, gewaschen, kurze

Zeit mit 5 ml 0,05 % Trypsin /0,02 % EDTA bei Raumtemperatur inkubiert und dadurch vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Nach mikroskopischer Kontrolle des Ablösevorgangs wurde der Trypsinisierungsvorgang mit dem Zufügen von 20 ml FGM abgestoppt. Es erfolgte die Aufnahme der Zellsuspension in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen um sie bei 1000 Upm für 5 Minuten zu zentrifugieren. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in dem FG-Medium resuspendiert und je nach Größe des Pellets 1:2 oder 1:3 verdünnt und in eine neue Zellkulturflasche verteilt. Ein Mediumwechsel erfolgte jeden zweiten Tag.

2.2.2 Versuche zur Zellproliferation mittels MTT-Test

2.2.2.1 Versuchsaufbau

Mit diesem Versuch sollte der Einfluß von Bortezomib auf das Proliferationsverhalten von allen fünf Zelllinien untersucht werden. Dazu wurden die Zellen für insgesamt 144 h (6 Tage) mit aufsteigenden Konzentrationen Bortezomib (0 nM, 1 nM, 2 nM, 4 nM, 6 nM, 8 nM, 10 nM) inkubiert und die Zellviabilität nach 24, 72 und 144 Stunden mittels MTT-Assay bestimmt. Zugleich wurde der Einfluss von Bortezomib auf die Proliferation an drei verschiedenen Zeitpunkten gemessen. Es erfolgte eine Nullwertbestimmung, nach 24 Stunden. Alle Experimente wurden dreimal wiederholt und bei jedem Experiment erfolgten Dreifachbestimmungen der jeweiligen Konzentrationen. Mit DMSO (1:1250) inkubierte Zellen dienten als Lösungsmittelkontrolle.

2.2.2.2 Prinzip des MTT-Assays

Der MTT-Assay ermöglicht eine kolorimetrische Messung von stoffwechselaktiven, somit lebenden Zellen in Relation zu ihrer Zellzahl. MTT ist die Abkürzung für die chemische Bezeichnung (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromid. Dies ist ein gelber Farbstoff, der durch Spaltung seines Tetrazoliumrings zu violetter, wasserunlöslichen Formazan umgesetzt wird. Diese Reaktion wird von Redoxenzymen, den NADH abhängigen Succinatdehydrogenasen der mitochondrialen Atmungskette katalysiert. Der intakte Stoffwechsel einer Zelle ist somit Voraussetzung und verweist auf einen aktiven Metabolismus einer Zelle, wodurch sich zwischen lebenden und toten

Zellen differenzieren lässt (Mosmann, 1983). Die Absorption des violetten Formazans, welche direkt proportional zu der Anzahl lebender Zellen ist, kann spektrophotometrisch mittels eines ELISA Readers quantifiziert werden.

2.2.2.3 Durchführung des MTT-Assays

Nach den gewünschten Zeitpunkten fand ein Absaugen des Nährmediums mit einer Mehrkanalpipette bei schräggehaltener Platte statt. Dies verhinderte eine Beschädigung des Zellrasens. Nach Zugabe von 100 µl MTT-Reagenz in jedes Well und 3 stündiger Inkubation bei 37° C, wurde das MTT-Reagenz, wie oben beschrieben, vorsichtig abgesaugt und durch 150 µl frisch angesetzte Stopp-Lösung ersetzt, ca. 15x durchmischt bis sich kein Niederschlag mehr bildete. Nach einer weiteren Inkubation für 30 Minuten wurde die optische Dichte photometrisch mittels eines ELISA Readers bei 570 nm mit einer Referenzwellenlänge von 630 nm bestimmt.

2.2.2.4 Durchführung des Proliferations-Assays

Aussaat der Zellen

Nach Kultivierung und Passagierung der Zellen (s. Abschnitt 2.2.1) wurden sie mit Trypsin/EDTA Lösung aus den Kulturflaschen abgelöst, mit 0,1 % Trypanblau gefärbt, um anschließend die Zellzahlbestimmung lichtmikroskopisch mit Hilfe der Neubauerzählkammer vorzunehmen. Jedes Well wurde mit FGM-Medium, um möglichst optimale Wachstumsbedingungen zu schaffen, und 10^5 Zellen versehen und bei 37° C für 24 Stunden inkubiert.

Nullwertmessung und Aufbringen der Konditionen

Neben der ersten kolorimetrischen Messung (Nullwertmessung) mittels MTT-Assay (s. Abschnitt 2.2.2.2.), erfolgte am zweiten Tag das Pipettieren der Konditionen entsprechend ihrer Verdünnung. Das alte Medium wurde durch 100 µl FCS2 % + 100 µl FCS2 % mit Bortezomib, der jeweiligen Konzentration entsprechend verdünnt, ersetzt und ohne vorheriges Waschen mit PBS bei 37° C für 24h inkubiert.

Die Konditionen wurden aus der Stocklösung von Bortezomib 2000 nM hergestellt. Als

Kontrolle diente eine DMSO-Verdünnung 1:62500 entsprechend einer Endkonzentration von 20 nM.

MTT-Assay nach 24 Stunden, 72 Stunden und 144 Stunden Inkubation

Nach 24, 72 und 144 Stunden Inkubation mit Bortezomib in unterschiedlichen Konzentrationen erfolgten kolorimetrische Messungen mittels MTT-Assay. Für den 144 Stunden Wert erfolgte am fünften Tag nach Aussaat der Zellen (96 Stunden Zeitpunkt), ein Mediumwechsel.

2.2.3 Caspase 3/7 Assay Promega

2.2.3.1 Versuchsaufbau

Mit dem CaspaseGLO^R3/7 Assay der Firma Promega wurde bei allen fünf Zelllinien (FTC133, Hth74, Kat4, TPC1, C643) mit dem Luminometer (GloMax Multimode Reader Promega, Mannheim, Deutschland) untersucht, ob es ohne und unter Stimulation der Zelllinien mit Bortezomib in steigenden Endkonzentrationen (5 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM) bei einer Inkubationszeit von 24 Stunden zu einer vermehrten Caspase-3-Aktivität kommt. Für alle Zelllinien wurden Zweifachbestimmungen vorgenommen und der Versuch dreimal durchgeführt.

Um die basale Caspase-Aktivität der Zelllinien zu eruieren, wurde zusätzlich eine Negativkontrolle (DMSO Medium + Zellen + Reagenz) angefertigt sowie eine Blank-Kontrolle (DMSO Medium + Reagenz), um die Hintergrund Lumineszenz festzustellen. Bei der Auswertung der Aktivitätssteigerung von Caspase-3 der einzelnen Zelllinien unter Bortezomibstimulation wurde der ermittelte Blankwert berücksichtigt und von den einzelnen gemessenen Lumineszenzwerten subtrahiert.

2.2.3.2 Prinzip des CaspaseGlo^R 3/7 Assays

Der CaspaseGLO^R 3/7 Assay ist ein lumineszenz-basierter Assay zur Bestimmung von Caspase-3-Aktivität in Säugetierzellen. Der Assay enthält in einem Reagenz, das optimale Bedingungen für Caspaseaktivität, Luciferaseaktivität sowie Zelllyse gewährleistet, ein prolyuminogenes Caspase3/7 Substrat, welches die Tetrapeptidsequenz

DEVD als Caspase-Schnittstelle enthält. Die Zugabe des Reagenz zum Medium im Kulturgefäß führt zu einer Zelllyse. Die Caspasen spalten das Substrat, wobei das Luciferasesubstrat Aminoluciferin entsteht, welches Lumineszenz erzeugt, die proportional zur vorhandenen Caspaseaktivität ist und daher als Maß für die Caspase abhängige Apoptose verwendet werden kann. Zusätzlich befindet sich in dem Reagenz eine Luciferase (Ultra-Glo™ rekombinierte Luciferase), die ein über lange Zeit stabiles Lumineszenzsignal gewährleistet (s. Abbildung 6)

2.2.3.3 Durchführung

Die Durchführung des CaspaseGLO^R 3/7 Assay wurde nach Anleitung vorgenommen und begann mit dem Aussäen der gewünschten Zelllinien in eine weiße 96-Well-Platte mit 1×10^4 Zellen in 200 μ l FGM pro Well (s. Abschnitt 2.2.2.4), welches nach 24 stündiger Inkubation durch 2 % FCS ersetzt wurde. Es folgte das Auftragen von 200 μ l der Negativ- und Blankkontrolle sowie des Nährmediums mit den gewünschten Endkonzentrationen von Bortezomib (s. Abschnitt 2.2.3.), eine 24 stündige Inkubation bei 37° C an die sich ein Ersetzen von 100 μ l Medium durch CaspaseGlo-Reagenz anschloss. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur konnte die Lumineszenzmessung vorgenommen werden.

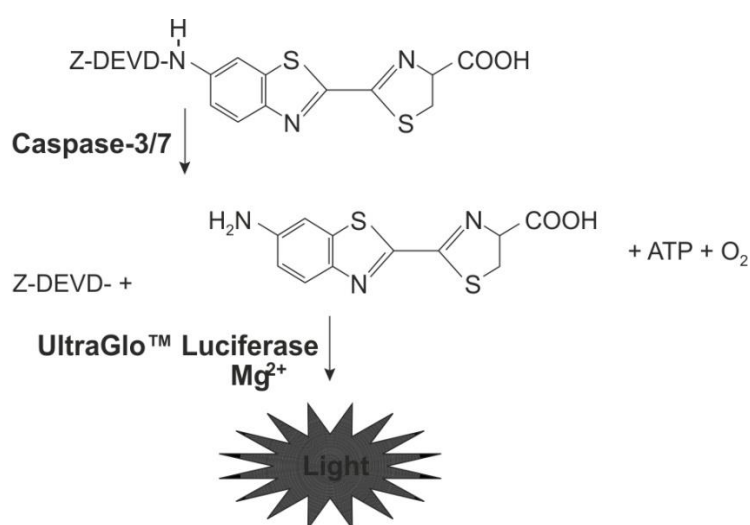


Abbildung 6: Prinzip CaspaseGlo^R 3/7 Assay

Spaltung des lumineszierenden DEVD enthaltenden Substrats mit anschließender Freisetzung eines Substrats (Aminoluciferin)

noluciferin) für Luciferase und der folgenden Erzeugung von Licht (aus „Caspase-Glo® 3/7 Assay Systems“ Technical Bulletin, www.promega.de).

2.2.4 Humaner Apoptose Array

2.2.4.1 Versuchsaufbau

Bei allen fünf Zelllinien (FTC133, TPC1, Kat4, C643, Hth74) wurde mit dem *Human Apoptosis Array Kit* (R&D Systems, U.S.A) der Einfluss von Bortezomib auf die Hoch- bzw. Runterregulation von 35 Komponenten des intrinsischen sowie extrinsischen Apoptosesignalwegs untersucht. Unbehandelte Zellen wurden mit stimulierten Zellen verglichen, die mit einer Endkonzentration von 100 nM Bortezomib behandelt wurden. Nach stattgehabter Inkubation erfolgte die Herstellung eines Zelllysats dessen Proteine mittels BCA-Reaktion quantitativ bestimmt wurden. Anschließend folgte die Durchführung des *Human Apoptosis Array Kits* wie es die Anleitung vorgibt. Der Versuch wurde für jede Zelllinie einmal durchgeführt.

2.2.4.2 Prinzip des Human Apoptosis Array Kits

Der *Human Apoptosis Array Kit* basiert auf dem ELISA-Verfahren (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, s. Abschnitt 2.2.8). Insgesamt lässt sich durch den Kit die relative Expression von 35 apoptoseassoziierten Proteinen nachweisen. Auf einer Nitrozellulosemembran befinden sich vielfältige Fänger-Antikörper, die über Nacht mit verdünnten Zelllysaten inkubiert werden. Am darauffolgenden Tag werden die Membranen gewaschen, um ungebundene Proteine zu entfernen. Es folgt eine erneute Inkubation mit biotinilierten Detektion-Antikörpern. Durch die Zugabe von Streptavidin-HRP und chemilumineszierenden Reagenzien erfolgt eine enzymatische kolorimetrische Reaktion, deren Intensität mit der Anzahl der an Fänger- Antikörpern gebundenen Proteinen korreliert.

2.2.4.3 Durchführung

Inkubation der Zellen

Die oben genannten Zelllinien wurden jeweils in zwei 175 cm² großen Kulturflaschen in FGM-Medium ausgesät und bei 37° C inkubiert bis der Boden der Flasche unter mikroskopischer Kontrolle nahezu konfluent bewachsen war und sich ca. 1×10^7 Zellen pro Kulturflasche befanden. Sobald dies der Fall war, fand ein Mediumwechsel mit 15 ml auf 2 % FCS statt. Die Zellen von je einer Flasche pro Zelllinie wurden zusätzlich mit einer Endkonzentration von 100 nM Bortezomib stimuliert. Die unbehandelte sowie die behandelte Zellkulturflasche wurden bei 37° C über Nacht inkubiert.

Herstellung des Zelllysats

Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen von der Zellkulturflasche abgelöst, das verbrauchte Medium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml PBS, ohne Mg²⁺/Ca²⁺, gewaschen.

Eine kurze Inkubation mit 5 ml 0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA bei Raumtemperatur half diese vom Boden der Kulturflasche abzulösen. Der Trypsinisierungsvorgang wurde mit 10 ml 2 % FCS abgestoppt, die Zellen in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgenommen und fünf Minuten bei 1000 Upm zentrifugiert, der Überstand abgezogen und das Pellet in 1 ml Lysepuffer15 Reagenz (aus dem *Human Apoptosis Array Kit*) resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde für 30 Minuten in einer Kältekammer bei 2° C - 8° C auf einem Rotationsrüttler inkubiert. Anschließend fand eine Zentrifugation der Zellsuspension für fünf Minuten bei 14000 rmf statt. Der Überstand wurde in ein frisches 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und das Pellet verworfen. Entweder wurden die Aliquots sofort weiterverwendet oder bis zur Weiterverwendung bei -80° C aufbewahrt.

BCA Protein Assay

Die ausführliche Beschreibung der Durchführung des BCA Protein Assays findet sich in Abschnitt 2.2.10.

Insgesamt durften 200-500 µg Protein pro Arraymembran eingesetzt werden mit einem maximalen Lysatvolumen von 250 µl pro Membran. Bei den hier durchgeführten Versuchen wurden jeweils 500 µg Protein eingesetzt.

Protokoll Humaner Apoptose Array Kit

In eine 4-well Multidish wurde pro Kammer 2 ml Array Puffer 1 pipettiert, um die Array-Membranen zu blocken.

Mit einer Flachpinzette wurden vorsichtig die Array-(Nitrozellulose-) Membranen mit der Nummerierung nach oben in die Wells einer 4-well Multidish mit 2 ml Array Puffer 1 gelegt und mit dem Deckel verschlossen. Nach der Benetzung der Array-Membran mit dem Array Puffer 1 verschwindet die blaue Färbung der einzelnen Fungantikörper Konglomerate und sie halten ihren spezifischen Platz ein. Es folgte eine einstündige Inkubation der Membranen auf einem Horizontalshaker, sodass die Längsenden der jeweiligen Membranen an die Wells anstießen („end to end“ Inkubation). In einem separaten 1,5 ml Eppendorfgefäß wurde 1,25 ml Array Puffer 1 pipettiert. Dieses Volumen wurde mit Lysepuffer 15 sowie dem errechneten Volumen des Zelllysats auf insgesamt 1,5 ml aufgefüllt, wobei das Zelllysatsvolumen 250 µl/Membranarray nicht überschreiten darf.

Nach der erfolgten Inkubationsstunde wurde der Array Puffer 1 aus den Wells entfernt, die frisch angesetzten verdünnten Zelllysate in die Wells pipettiert, mit einem Deckel verschlossen und über Nacht bei 4° C auf einem Horizontalshaker inkubiert. Am nächsten Morgen mussten die Arraymembranen vorsichtig mit einer Flachpinzette aus dem 4-well Multidish entfernt, in vier runde mit 20 ml frisch angesetztem 1x Waschpuffer gefüllten Petrischalen gelegt und dreimal für 10 Minuten auf einem Horizontalshaker mit frisch angesetztem 1x Waschpuffer gewaschen werden.

Es folgte, nach Ablauf des Waschpuffers, eine einstündige Inkubation auf einem Horizontalshaker in der mit 1,5 ml/well frisch angesetzten 1xArray Puffer 2/3 (6 ml) und 60 µl Detektion Antikörper Cocktail-Lösung gefüllten 4-well Multidish und anschließend erneut ein dreimaliger Waschgang der Membranen wie oben bereits ausführlich beschrieben.

Es folgte eine 30 minütige Inkubation auf einem Horizontalshaker in der 4-Well-Multidish in einer 1,5 ml/Well gefüllten frisch angesetzten 3 µl Streptavidin-HRP in 1xArray Puffer 2/3 (6 ml) verdünnten Lösung auf die wiederum das dreimalige Waschen nach dem bekannten Muster folgte.

Die sich anschließende Detektion der Proteine gelang mit dem Amersham ECL *Westernblotting Detection Kit* (Ge, Healthcare, UK), wozu die Lösungen „Luminol“ und

„Enhancer“ 1:1 gemischt, die Membranstreifen damit für eine Minute benetzt und die chemilumineszierende Membran zwischen dreißig Sekunden und zehn Minuten belichtet wurde. Die Filmentwicklung erfolgte anschließend im Optimax (Protec GmbH, Deutschland).

Semiquantitative Datenauswertung

Die positiven Signale konnten nach der Entwicklung sofort leicht mit der durchsichtigen Auflage, die jedem Protein Koordinaten zuweist, identifiziert werden (s. Abbildung7). Die Ausrichtung der transparenten Auflage fand anhand der drei Positivkontrollen statt, die sich in jeder Ecke befanden. Ein Appendix informierte über die jeweilige Lokalisation der Antikörper. Nach der Entwicklung zeigten die den Proteinen zugeordneten Kreise unterschiedlich starke Intensitäten, wodurch auf die relative Anzahl der Proteine rückgeschlossen werden konnte. Dies wurde anschließend zur Auswertung und Übersicht in diversen Tabellen dargestellt.

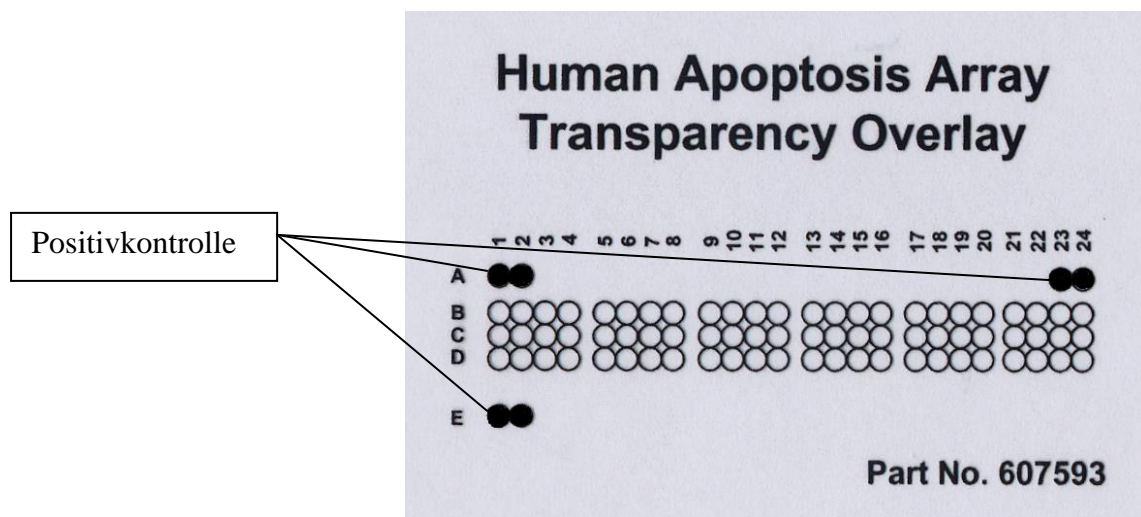


Abbildung 7 : Durchsichtige Auflage zur Identifizierung der Proteine
(aus „Proteome Profiler Human Apoptosis Array Kit“, www.rndsystems.com)

2.2.5 Zellzyklusanalyse mit Propidiumiodid und Durchflusszytometrie

2.2.5.1 Versuchsaufbau

Mithilfe der Durchflusszytometrie, genutzt wurde LSRII von Becton Dickinson, Bioscience, (BD Franklin Lakes NJ) und der Farbstoff Propidiumiodid, fand für alle Zelllinien (FTC133, TPC1, Kat4, C643, Hth74) eine Analyse des Zellzyklus unter Stimulation mit Bortezomib mit 10 nM und 20 nM nach 24 Stunden Inkubation sowie auch unbehandelter Zellen statt. Mit DMSO (1:1250) behandelte Zellen dienten als Lösungsmittelkontrolle. Die Messungen wurden mit dem der Systemsoftware CellQuest PRO(BD) und dem Betriebssystem Macintosh V3.0 aufgenommen und mit ModFitLT V3.1 (Verity Software House, Topsham, ME) weiterbearbeitet und ausgewertet. Die Daten wurden als zweidimensionale Punktdiagramme (*dot plots*) und als eindimensionale Histogramme dargestellt. Durch Setzen von Analysefenstern (*gates*) in den Punktdiagrammen kann die Expressionsanalyse auf bestimmte Zellpopulationen eingegrenzt werden. Die Zellzyklusanalyse erfolgte für jede Zelllinie einmal.

2.2.5.2 Prinzip der Zellzyklusanalyse mit Propidiumiodid und der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie stellt eine moderne Methode dar, zelluläre Parameter, wie z.B. das Volumen oder die Granularität einer großen Anzahl von einzelnen Zellen, in kurzer Zeit zu erfassen. Als Grundlage dient die Passage von Einzellzellsuspensionen durch einen Laserstrahl. Dabei erzeugt Streu- sowie Fluoreszenzlicht wird separat von verschiedenen photosensitiven Detektoren, sog. Photomultiplern erfasst.

Die Menge des gestreuten Lichts korreliert mit dem Volumen und der Komplexizität der Zellen, sodass Rückschlüsse auf die Größe der einzelnen Zellen und deren inneren Beschaffenheit gezogen und sie so differenziert werden können. Während die Zellen den fokussierten Laserstrahl passieren, wird die dabei entstehende Lichtstreuung in einem engen Winkel zum Laserlicht als Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*) sowie in einem 90° Winkel als Seitwärtsstreulicht (*side scatter*) detektiert. Das Vorwärtsstreulicht spiegelt die Größe einer Zelle wider, das Seitwärtsstreulicht deren Granularität und Membranfaltung.

Für diesen Versuch, der Analyse des Zellzyklus, ist jedoch die Möglichkeit der Durchflusssyztometrie der Fluoreszenzmessung wichtiger. Die Zellen werden dafür zunächst mit einem Farbstoff markiert. Verwendung fand in diesem Versuch Propidiumiodid welches stöchiometrisch ca. alle 4-5 Basen in die DNA interkaliert. Durch dieses stöchiometrische Verhalten korreliert die Intensität der von den Kanälen des FACS-Geräts aufgenommenen emittierten Fluoreszenzsignale mit der Quantität des DNA-Gehalts einer Zelle. So lassen sich Zellen mit einfachem DNA-Gehalt von Zellen mit doppeltem DNA-Gehalt differenzieren, wodurch eine Zuordnung der Zellen in die verschiedenen Phasen des Zellzyklus möglich ist.

Durch die Eigenschaft von Propidiumiodid in jede Nukleinsäure zu interkalieren, so auch in doppelsträngige RNA, ergibt sich die Notwendigkeit, die Zellen vor der FACS Analyse mit RNase zu behandeln.

2.2.5.3 Durchführung

Die Vorbereitung für die Analyse im FACS Calibur-Gerät gliederte sich in zwei Schwerpunkte, die Fixierung, um die Membranen der Zellen für Propidiumiodid permeabel zu machen und die Färbung durch Propidiumiodid.

Inkubationsbedingungen

Die, wie im Abschnitt 2.2.1. beschrieben, kultivierten Zellen wurden mit mindestens 10^6 Zellen/well in 3 ml FGM und 10 % FCS in einer 6 Well- Platte ausgesät und bei 37° C inkubiert. Nach 24 Stunden folgte die Behandlung der Zellen mit Bortezomib, wobei die Konditionen, wie in dem Abschnitt 2.2.3.1 beschrieben, gewählt wurden.

Fixierung

Nach 48 Stunden konnte mit der Fixierung der Zellen begonnen werden. Zunächst wurde der Überstand der Wells abgezogen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit einem Trypsin/EDTA-Gemisch von dem Boden der Wells abgelöst und mit PBS gestoppt. Nach der Überführung der Zellsuspension in 10 ml PBS in Zentrifugenröhrchen konnte das Zentrifugieren bei Raumtemperatur für 5 Minuten bei 1500 rpm beginnen. Es folgte die Resuspension des entstandenen Pellets in 1 ml PBS, die Überführung in ein 1,8 ml Eppendorfgefäß und die Wiederholung der Zentrifugation für 5 Minuten bei 1500 rpm.

Erneut wurde der Überstand abgekippt und darauf geachtet möglichst viel PBS vom Pellet abzuziehen, sodass nun langsam und tropfenweise 1 ml 70 % Ethanol (-20° C) zugegeben werden konnte. Die Fixierung erfolgte bei 4° C über Nacht oder für einen längeren Zeitraum bei -20° C.

PI-Färbung

Die fixierten Zellen mussten aufgetaut werden, um sie dann einer Zentrifugation bei 4° C und 3000 rpm für 10 Minuten zuführen zu können. Der entstandene Überstand wurde verworfen, die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen, erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert, der Überstand ebenso verworfen um schließlich das Pellet in 300 µl PI-RNase Lösung (50 µg/ml PI, 200 µg/mlRNase) in einem FACS-Röhrchen aufnehmen zu können und 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln zu inkubieren. Es folgte nun die durchflusszytometrische Messung mit dem LSRII. Das PI-Signal wurde dabei im Fluoreszenzkanal 2 (FL2) bei einer Wellenlänge von 564-606 nm aufgenommen und wie im Abschnitt 2.2.3.2 beschrieben weiterverarbeitet.

2.2.6 NFκB p65 Transcription Factor Assay Kit

2.2.6.1 Versuchsaufbau

Mit dem NFκB p65 Transcription Factor Assay Kit der Firma Active Motif wurde der Einfluss von Bortezomib mit steigenden Endkonzentrationen auf die Herunterregulation von NFκB bei allen fünf Zelllinien (FTC133, Kat4, TPC1, Hth74, C643) untersucht. Zusätzlich erfolgte immer die Bestimmung einer Positivkontrolle sowie eines Blankwertes.

Nach der Herstellung eines Nuklearextrakts mit dem *Jurkat nuclear extract Kit* von Active Motif, folgte eine quantitative Proteinbestimmung mittels BCA. Anschließend wurde der NFκB p65 Transcription Factor Assay nach Anleitung durchgeführt. Je Probe fanden Doppelbestimmungen statt.

2.2.6.2 Prinzip des Jurkat Nuclear Extract Kit

Für die Gewinnung des Nuklearextrakts aus den gewünschten Zellen findet eine Resuspension dieser in einem hypotonischen Puffer statt, was diese anschwellen lässt und bewirkt, dass die Zellmembranen der Zellen fragil werden. Unter Zugabe von dem im Kit mitgeliefertem Detergenz entweicht die zytoplasmatische Fraktion in den Überstand, der separat gesammelt und aufbewahrt wird. Die nuklearen Proteine des restlichen Pellets werden in einem Lysepuffer gelöst, der mit einem Protease Inhibitor Cocktail versetzt ist.

2.2.6.3 Durchführung

Die Zellen wurden in sechs 75 cm² Zellkulturflaschen in 2 % FCS ausgesät. Vier Ansätze wurden mit aufsteigenden Endkonzentrationen von Bortezomib behandelt (10 nM, 50 nM, 100 nM, 1000 nM), ein Ansatz blieb unbehandelt mit lediglich FCS 2 % und der letzte Ansatz wurde mit DMSO (1:1000 verdünnt) versehen. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37° C erfolgte die Herstellung des Nuklearextrakts.

Zellgewinnung

Nach 24 Stunden Inkubation bei 37° C wurde unter sterilen Bedingungen das Medium abgezogen und die Zellen vorsichtig mit jeweils 5 ml eiskaltem PBS/Phosphatase Inhibitor gewaschen und mit 3 ml eiskaltem PBS/Phosphatase Inhibitor versetzt. Der Phosphatase-Inhibitor diente dazu, weitere Proteinmodifikationen wie z.B. Proteolyse und Dephosphorylierung zu verhindern. Mit einem Zellscraper wurden die Zellen vorsichtig vom Boden der Zellkulturflasche gelöst, in vorgekühlte 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 Minuten bei 500 rpm und 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Pellet auf Eis gegeben.

Gewinnung der zytoplasmatischen Fraktion

Eine vorsichtige Resuspension des auf Eis gegebenen Pellets in 500 µl hypotonischem Puffer schloss sich an. Die Zellsuspension wurde darauf in ein vorgekühltes E-cup überführt und 15 Minuten auf dem Eis inkubiert. Es folgte die Zugabe von 25 µl Detergenz, ein Vortexen der Zellsuspension für 10 Sekunden bei 2500 upm und eine anschließende Zentrifugation für 30 Sekunden bei 13000 rpm in einer auf 4° C vorgekühl-

ten Zentrifuge. Der dabei entstandene Überstand, die zytoplasmatische Fraktion, wurde in ein vorgekühltes E-Cup pipettiert und bei -80°C aufbewahrt. Das Pellet wurde weiterverwendet.

Gewinnung der nuklearen Fraktion

Das bei der Gewinnung der zytoplasmatischen Fraktion entstandene Pellet wurde in 50 μl Komplettem Lysepuffer resuspendiert und darauf für 10 Sekunden bei 2500 upm gevortext. Es folgte eine 30 minütige Inkubation auf dem Minishaker bei 150 rpm. Die Zellsuspensionen wurden dann für 30 Sekunden bei 2500 upm gevortext, anschließend für 10 Minuten in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge bei 13000 rpm zentrifugiert und der erhaltene Überstand, der Nuklearextrakt, in vorgekühlte E-Cups pipettiert, aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

BCA Assay

Für die Proteinbestimmung der Nuklearextrakte wird wieder das BCA-Protein Assay Kit der Firma Pierce genutzt. (s. Abschnitt 2.2.10) Für den folgenden NF κ Bp65 Transcription Factor Assay Kit werden 10 μg Protein aus dem Nuklearextrakt eingesetzt.

2.2.7 Prinzip des NF κ Bp65 Transcription Factor Assay Kit

Der NF κ B *Transcription Factor Assay Kit* basiert auf dem ELISA-Prinzip. Die mitgelieferten 96 well Mikrotiterplatten enthalten immobilisierte Oligonukleotide, die die NF κ B übereinstimmende Sequenz von 5'-GGGACTTTCC-3' aufweisen. Die aktive Form von NF κ B, die in dem Nuklearextrakt (s. Abschnitt 2.2.7.2) vorhanden ist, bindet an dieses Oligonukleotid. Unter Verwendung eines spezifischen Primärantikörpers werden nur aktivierte und mit der Ziel-DNA verbundene NF κ B p65 oder p50 Epitope detektiert. Ein weiterer HRP-konjugierter Sekundärantikörper ermöglicht, nach Zugabe eines geeigneten Substrats, eine kolorimetrische Reaktion, die dann mit einem Spektrometer gemessen und quantifiziert werden kann. Die Intensität der kolorimetrischen Reaktion ist dabei proportional zur Quantität der aktiven NF κ B Transkriptionsfaktoren.

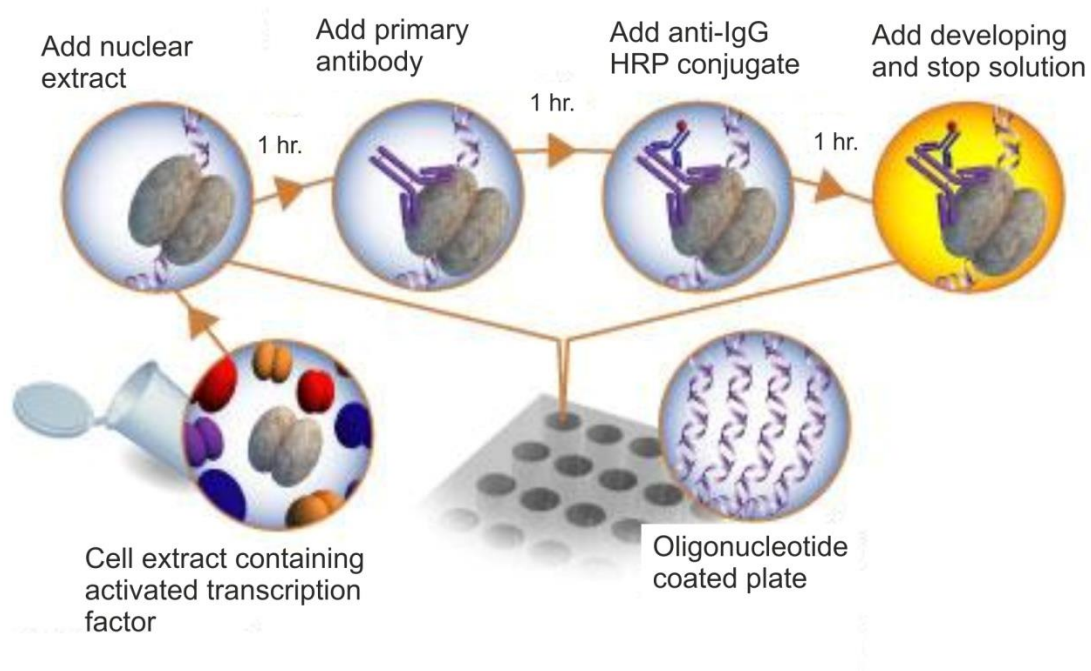


Abbildung 8: Bildliche Darstellung des Prinzips des NFkBp65 Transcription Factor Assay Kit

(aus „Active Motif TransAM Transcription Factor ELISAs (DNA binding of activated transcription factors)", www.activemotif.com)

2.2.7.1 Durchführung

Bindung von NFkB an die übereinstimmende Sequenz

In jedes Well wurden 30 µl Complete Binding Puffer vorgelegt. In die für die behandelten Proben vorgesehenen wells wurde je Probe die Menge, die 10 µg Nuklearextrakt entsprach, pipettiert und auf 20 µl Lysepuffer ergänzt.

In die Wells der Positivkontrollen wurden jeweils 20 µl des Kompletten Lysepuffers pipettiert, die mit je 2,5 µg Jurkat Nuclear Extract versetzt waren. In die Wells, die als Blank galten, wurden lediglich 20 µl Kompletten Lysepuffer pipettiert, ohne Zusatz jeglichen Proteins.

Die Mikrotitrierplatte wurde abgedeckt und eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Rotationsrüttler bei 100 rpm inkubiert. Es folgte ein Waschgang mit je 200 µl 1x Waschpuffer pro Well, der dreimal durchgeführt wurde.

Bindung Primärantikörper

Pro Well wurden 100 µl 1:1000 in 1x Antikörperbindungspuffer verdünnter NFkB Anti-

körper pipettiert, die Platte erneut abgedeckt und für eine Stunde bei Raumtemperatur ohne Schütteln inkubiert.

Es folgte ein Waschgang mit je 200 µl 1xWaschpuffer pro well, der dreimal durchgeführt wurde.

Bindung Sekundärantikörper

In alle Wells wurde 100 µl 1:1000 in 1xAntikörperbindungspuffer verdünnter HRP Antikörper pipettiert, die Platte abgedeckt und für eine Stunde ohne schütteln inkubiert. Es folgten vier Waschgänge mit je 200 µl 1xWaschpuffer.

Kolorimetrische Reaktion

In alle Wells wurde 100 µl auf Raumtemperatur gebrachte Entwicklungslösung pipettiert und folgend für 3 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Es ließ sich ein Farbumschlag von mittel- zu dunkelblau beobachten. Anschließend wurden je well 100 µl Stopp-Lösung zugegeben. Es ergab sich nun ein Farbumschlag nach gelb. Innerhalb der nächsten fünf Minuten erfolgte die Absorptionsmesung bei 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 655 nm.

2.2.8 Proteinchemische Methoden

2.2.8.1 Versuchsaufbau

Mittels Western Blot Analyse sollte die Induktion von GRP78 sowie CHOP unter dem Einfluss von Bortezomib für alle fünf Schilddrüsenzelllinien (Hth74, C643, Kat4, TPC1, FTC133) untersucht werden. Dazu erfolgten zunächst Stimulationsversuche der einzelnen Zelllinien mit Bortezomib in aufsteigenden Endkonzentrationen (0,1 nM, 1 nM, 10 nM). Als Kontrollen dienten unbehandelte und mit DMSO 1:10 verdünnt behandelte Zellen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden Zelllysate hergestellt, der Proteingehalt mittels BCA-Reaktion bestimmt und die Proteine durch die SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und per Immunoblotting identifiziert und semiquantifiziert.

2.2.8.2 Stimulationsversuche für Western Blot Analysen

Die Zellen wurden in fünf 75 cm² Kulturflaschen in FGM-Medium ausgesät. Nachdem die Zellen den Boden der Zellkulturflasche konfluent bedeckten, fand ein Mediumwechsel auf 2 % FCS statt und eine Inkubation bei 37° C für 24 Stunden. Es folgte der Stimulationsversuch mit Bortezomib, wie im Abschnitt 2.2.8.1 beschrieben. Alle Ansätze wurden für 24 Stunden bei 37° C inkubiert. Anschließend erfolgte die Herstellung des Zelllysats.

Herstellung des Zelllysats

Die ersten Schritte sind unter Abschnitt 2.2.4.3 bereits aufgeführt worden. Die so entstandene Zellsuspension wurde in ein 15 ml Greiner-Röhrchen pipettiert, bei 1500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand des Zentrifugats vorsichtig abgezogen und das Pellet ab diesem Zeitpunkt auf Eis gelegt. Je nach Pelletgröße wurde es mit 10-40 ml RIPA- Puffer + Proteaseinhibitoren versetzt.

1 ml RIPA: 10 µl PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)

30 µl Aprotinin

10 µl Sodium Orthovanadate 100 nM

Das Pellet wurde mit 200 µl Pipettentips suspendiert, mit 2 µl PMSF versetzt und für 60 Minuten auf Eis inkubiert, die Suspension anschließend in 1 ml Eppendorf-Cups überführt und diese bei 4° C in einer Kühlzentrifuge bei 13000 Upm zentrifugiert. Der Überstand dieses Zentrifugats wurde als Lysat abpipettiert und bei -80° C bis zum Gebrauch aufbewahrt.

2.2.9 BCA-Protein Assay

Durch die BCA-Reaktion (Bicinchoninsäure,2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure) können Proteine quantitativ kolorimetrisch bestimmt werden. Dabei wird die Eigenschaft der Proteine genutzt, dass sie über ihre Peptidbindungen in alkalischer Lösung zweiwertige Kupferionen (Cu²⁺) zu einwertigen Kupferionen (Cu¹⁺) reduzieren (Biuret Reaktion), welche dann einen Komplex aus Kupferionen und Protein bilden. Die einwertigen Kupferionen wiederum bilden einen violetten Farbkomplex mit Bicinchoninsäu-

re, der photometrisch gemessen werden kann.

In dieser Arbeit wurde das BCA-Protein Assay Kit der Firma Pierce genutzt, das aus einem Reagenz A (BCA) und B (Kupferlösung) sowie einem Proteinstandard besteht. Angesetzt wurde ein Reagenzgemisch von Lösung A und Lösung B in einem Verhältnis von 50:1. In einer 96-Well Mikrotiterplatte wurde für die zu bestimmenden Proben sowie für die Proteinstandardreihe ein Reagenzgemisch von 200 µl vorgelegt. Durch Verdünnung der Stocklösung mit RIPA-Puffer wurde eine aus vier verschiedenen Konzentrationen (0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 1,5 mg/ml, 2 mg/ml) bestehende Proteinstandardreihe hergestellt. Zu dem 200 µl vorgelegten Reagenzgemisch wurden 10 µl je Standard und 2,5 µl je Probe (Verdünnungsfaktor 4) hinzupipettiert und die Ansätze gut gemischt. Nach 15 Minuten Inkubationszeit bei 37° C erfolgte die photometrische Bestimmung des Proteingehalts gegen die Standardkurve im Spektralphotometer (Emax; Molecular Devices) bei 570 nm.

2.2.10 Western Blot

2.2.10.1 Prinzip der Western Blot-Analyse

Mithilfe der Western Blot Methode können die auf einer Trägermatrix (hier: Polyacrylamid-Gel) elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen werden. Diese Übertragung wird als das eigentliche „Blotting“ bezeichnet. Das Muster, welches dabei auf der Membran entsteht, ist identisch mit dem der Trägermatrix. Der Western Blot ermöglicht durch das „Blotting“ die Identifikation spezifischer Antigene mittels mono- oder polyklonaler Antikörper und erlaubt sowohl den qualitativen Nachweis als auch eine semiquantitative Bestimmung einzelner Proteine.

2.2.10.2 Durchführung

SDS- Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE wurden die Proteine mit dem anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat 10 % (sodium dodecyl sulfate, SDS) vorbehandelt, wodurch zum einen die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine verloren ging und zum anderen durch die

Übertragung negativer Ladungen auf die Proteine, dessen Eigenladungen maskiert wurden. Dadurch waren die Proteine gleichmäßig negativ geladen. Dies hatte zur Folge, dass die Proteine nach ihrer molaren Masse getrennt wurden. Größere Proteine sammelten sich nahe der Auftragsstelle, während kleinere Proteine schneller wanderten. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte mittels einer diskontinuierlichen SDS-Page bestehend nach Laemmli (Towbin et al., 1992). Dies erforderte zwei Gelsysteme, Sammel- und Trenngel, sowie verschiedene Pufferlösungen. Die Proteine konzentrierten sich bei ihrer Wanderung zunächst im Sammelgel, um dann im Trenngel aufgetrennt zu werden. Die unterschiedliche pH-Differenz zwischen Sammel- und Trenngel führte zu einer Fokussierung der Proteine, bei Eintritt dieser in das Trenngel, auf eine scharfe Bande.

Die Zusammensetzung der Gele ist im Folgenden aufgelistet:

Edukte:	Trenngel 12%	Sammelgel 4%
Aqua bidest	3,4 ml	6,1 ml
Acrylamid/Bis	4,0 ml	1,3 ml
Trenngelpuffer (1,5 M Tris, pH 8,8)	2,5 ml	- -
Sammelgelpuffer (0,5 M Tris, pH 6,8)	- -	2,5 ml
SDS 10 %	0,1 ml	0,1 ml
Polymerisation:		
25 % APS	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	10 µl

Für die Herstellung der Trenn- und Sammelgele, zuvor erfolgte die Reinigung aller benötigten Materialien mit Ethanol, wurden die Komponenten wie oben aufgeführt zusammenpipettiert, gut gemischt und zwischen die montierten Glasplatten gegossen. Nach der Polymerisation des Trenn- sowie des Sammelgels wurden die Gele in die Elektrophoresekammer eingespannt und die Kammer mit 1x Elektrophoresepuffer (500 ml) aufgefüllt, sodass die Gele komplett bedeckt waren.

Die bei -80° C gelagerten Proteinlysate wurden langsam auf Eis aufgetaut und Probenvolumen für 50 µg Protein (CHOP) bzw. 20 µg Protein (GRP78), entsprechend der BCA-Bestimmung in Eppendorf Cups pipettiert. Das Probenvolumen wurde mit Aqua

bidest auf 10 µl gebracht sowie 10 µl von einem Gemisch aus 475 µl Probenpuffer und 25 µl β-Mercaptoethanol, welches die Disulfidbrücken durch Reduktion spaltete, hinzupipettiert. Es folgte die Denaturierung aller Proben, einschließlich des Proteinmarkers, bei 95° C für drei Minuten und anschließend eine kurze Zentrifugation.

Mittels Loading Tips wurden 20 µl Probe in die Kammern des Sammelgels aufgetragen. Die beiden äusseren Kammern wurden mit den Proteinmarkern versehen. Die Spannung von 85 Volt wurde so lange angelegt, bis die Proteine das Trenngel erreicht hatten (sichtbar am Probenpuffer), dann wurde die Spannung auf 115 Volt erhöht bis der Probenpuffer am unteren Ende des Gels auslief.

Western Blot

Das Blotten, die Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran, gelingt durch ein senkrecht zur Laufrichtung des Gels angelegtes elektrisches Feld, das die Proteine auf die Membran transferiert und dank hydrophober Wechselkräfte immobilisiert. Das Muster der Proteinbanden bleibt dabei erhalten. Der Transfer wurde mittels Semi-dry Blot Methode durchgeführt.

Semidry-Blot

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele aus der Kammer entfernt, mit einem Skalpell die beiden Gelphasen getrennt und das Trenngel dann für mindestens 20 min. in 10xTransferpufferlösung äquilibriert. Ebenso wurden die Membran und Filterkartons in der Transferpufferlösung für 10 Minuten äquilibriert. Nach Anfeuchtung der Elektrodenplatten mit Aqua Bidest, erfolgte der Zusammenbau des Semi-Dry-Blots aus Filterkarton, der Nitrocellulosemembran, dem Gel und erneut dem Filterkarton. Möglicherweise entstandene Luftblasen wurden nach jeder Lage mit einer angefeuchteten dünnen Pipette entfernt. Nach dem Schließen der Kammer wurde ein Strom von 10 Volt für 20 Minuten angelegt, der dann wiederum für weitere 20 Minuten auf 15 Volt erhöht wurde. Nach dem Blotten wurde die Nitrocellulosemembran gemäß der jeweiligen Molekulargewichte von β-Actin sowie GRP78 oder CHOP in zwei Streifen geschnitten.

Protein	Molekulargewicht (k DA)
GRP78	78
CHOP	27
β - Actin	42

Die zugeschnittenen Streifen mit β -Actin sowie GRP78 mussten auf einem Rotations-schüttler unter langsamen Schwenken in 1,5 % Western blocking Reagenz (TBS + Western blocking Reagent, Roche Diagnostics) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert werden. CHOP wurde in Western blocking Reagenz (Magermilchpulver + TBST) unter gleichen Bedingungen inkubiert.

2.2.10.3 Prinzip Nachweisreaktion/Immunoblot

Durch das Western blocking Reagenz werden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abgesättigt. Dadurch wird der spezifische Nachweis von Antigenen ermöglicht.

Die Immundetektion erfolgt nach dem Antigen-Antikörper-Bindungs-Prinzip. Zunächst bindet ein monoklonaler Primärantikörper an sein Antigen (in diesem Fall bestimmte Proteine), welche auf der Membran fixiert sind. An die Fc-Region, ein konstanter Bereich des Primärantikörpers, bindet wiederum ein polyklonaler Sekundärantikörper, der mit dem Enzym HRP (horseradish peroxidase) konjugiert ist und aus einer anderen Spezies stammt. Das Enzym katalysiert die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form. Dabei entsteht Chemilumineszenz, die mit Hilfe eines Röntgenfilms detektiert werden kann (s. Abbildung 9).

Diese Art des Nachweises spezifischer Proteine wird als indirekte Visualisierung bezeichnet, im Gegensatz zu der direkten Visualisierung bei der der Sekundärantikörper direkt mit einem Radionuklid oder Fluoreszenzfarbstoff versehen ist. Zusätzlich verstärken die sekundären polyklonalen Antikörper das Primärantikörpersignal, da mehr als ein Sekundärantikörper an den Primärantikörper binden kann.

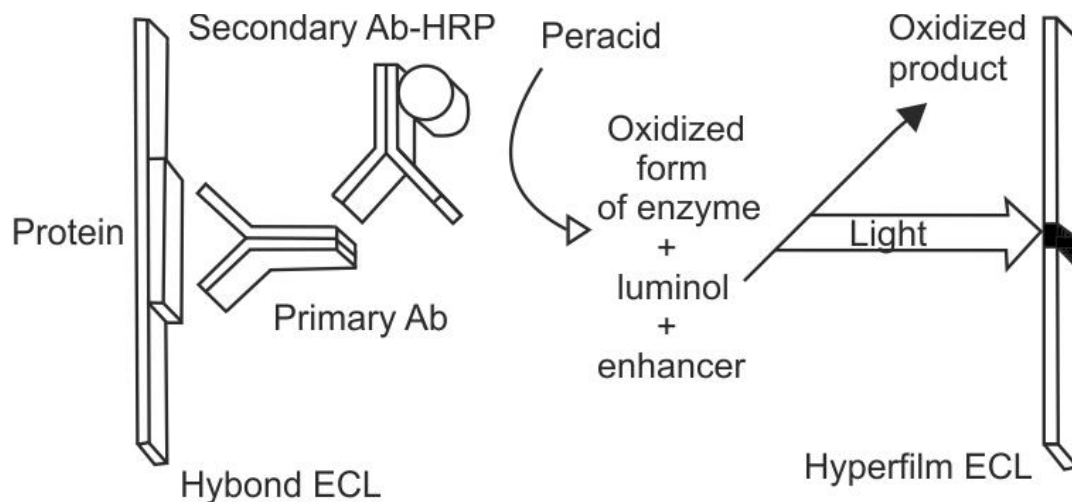


Abbildung 9: Prinzip des ECL Western Blots

(aus „Amersham ECL Western blotting detection reagents and analysis system“, www.gelifesciences.com)

Bindung des Primärantikörpers

Nach Absättigung freier Bindungsstellen auf der Membran durch ein Blockierungsreagenz, anschließendem kurzen Waschen in TBS, folgte die Inkubation des Primärantikörpers in einer Petrischale in Western blocking Reagenz in TBS-Tween verdünnt, auf einem Rotationsschüttler unter langsamen Schwenken bei 4° C .Die Inkubation beträgt bei dem zurechtgeschnittenen Membranstreifen mit β -Actin 40 Minuten, während sie bei den Membranstreifen mit dem Primärantikörper über Nacht andauerte.

Protein	Verdünnung
GRP78	1:4000
CHOP	1:100

Nach Bindung der Primärantikörper folgte ein dreimaliges Waschen der Membranen in frisch angesetzter 0,5 % TBS-Tween Lösung.

Bindung Sekundärantikörper

Mit einem 1:2000 in einer Westernblocking-Reagenz Lösung (WBR + TBST) verdünntem Antikörper, wurden die gewaschenen Membranstreifen bei Raumtemperatur für 40 Minuten mit der Antikörperlösung inkubiert. Es folgten drei fünfminütige Waschgänge in frisch angesetzter 0,1 % TBS-T Lösung sowie zwei in frisch angesetztem TBS.

Detektion

Die Detektion der Proteine erfolgte mit dem Amersham ECL *Westernblotting Detection Kit* (GE Healthcare, UK). Die Lösungen „Luminol“ und „Enhancer“ wurden 1:1 gemischt und die Membranstreifen damit für eine Minute benetzt. Die zwischen einem Filterpapier fast getrockneten Membranstreifen wurden in der gewünschten Reihenfolge zwischen einer Plastikfolie angeordnet, in einer Filmkassette mit Klebestreifen fixiert und im Dunkelraum der Röntgenfilm aufgelegt. Dieser wurde zwischen zehn Sekunden und zehn Minuten durch die chemilumineszierende Membran belichtet. Die Filmentwicklung erfolgte anschließend im Optimax (Protec GmbH, Deutschland).

2.2.11 Statistik

Für die statistische Auswertung und die graphische Darstellung wurden Microsoft Excel[®] und SPSS 15.0 verwendet. Mittelwert und Standardabweichung wurden für alle Messpunkte der Zellversuche bestimmt. Mittels Kolmogorov-Smirnov-Test (K-S-Test) wurden die Daten auf Normalverteilung untersucht, dann paarweise Mittelwertvergleiche durchgeführt.

Falls eine Normalverteilung der Daten vorliegt, ist der T-Test für paarige Stichproben der optimale Test. Eine Logarithmierung der Daten führt im Allgemeinen zu einer noch besseren Annäherung an die Normalverteilung. In Messreihen, bei denen der Wert null vorkommt, für den man keinem Logarithmus bilden kann, wurden, um ein einheitliches Vorgehen zu gewährleisten, die Werte nicht verändert. Bei Nichtvorliegen der Normalverteilung, wurde auf den T-Test verzichtet und entsprechend die nichtparametrische Variante (Wilcoxon-Test) durchgeführt. Der Wilcoxon-Test hat weniger Power als der T-Test, aber kann auch bei nicht normalverteilten Daten verwendet werden.

Wegen des explorativen Charakters der Untersuchung wird keine alpha-Korrektur für multiples Testen durchgeführt. Es werden nominale p-Werte angegeben.

Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt:

- | | |
|----------------------------|------------------------|
| • keine Signifikanz (kS) | entspricht $p > 0,05$ |
| • signifikant (*) | entspricht $p < 0,05$ |
| • sehr signifikant (**) | entspricht $p < 0,01$ |
| • höchst signifikant (***) | entspricht $p < 0,001$ |

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse zur Proliferation

Zu Beginn der Untersuchungen wurde der Einfluss von Bortezomib auf die Proliferation der in dieser Arbeit verwendeten Schilddrüsenzelllinien untersucht. Die Versuchsreihen erstreckten sich dabei über insgesamt 144 Stunden, wobei nach 24, 72 und 144 Stunden die kolorimetrische Messung mittels MTT-Assay zur Bestimmung der Zellviabilität durchgeführt wurde. Für alle Zelllinien konnte eine zeit- und dosisabhängige Reduktion der Zellzahl unter Bortezomibbehandlung nachgewiesen werden. Die nachfolgenden Abbildungen 10, 11 und 12 stellen dies für alle untersuchten Zelllinien dar.

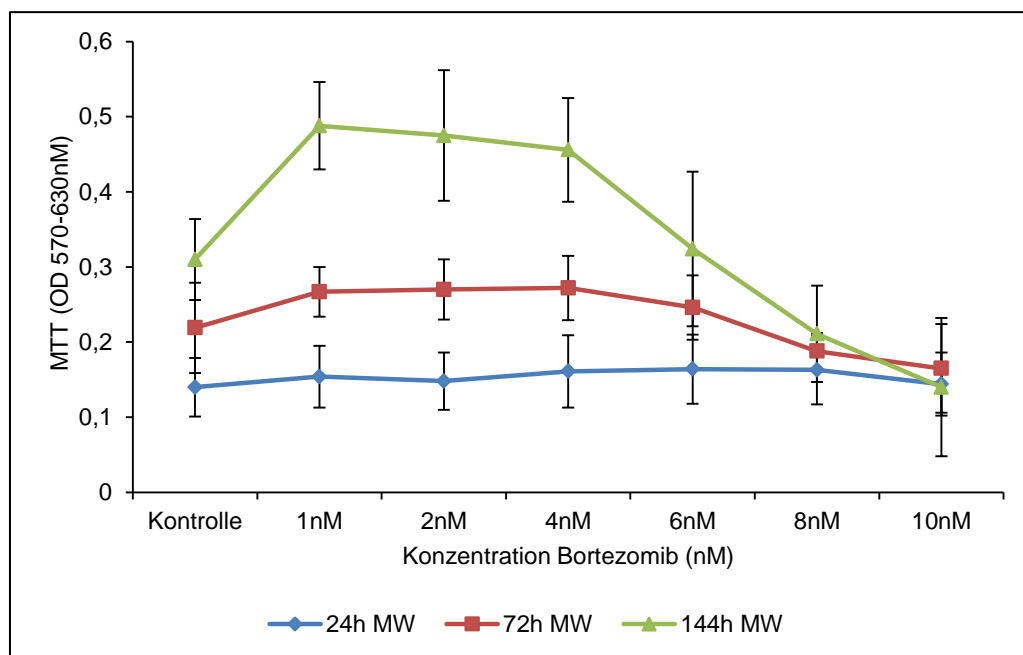
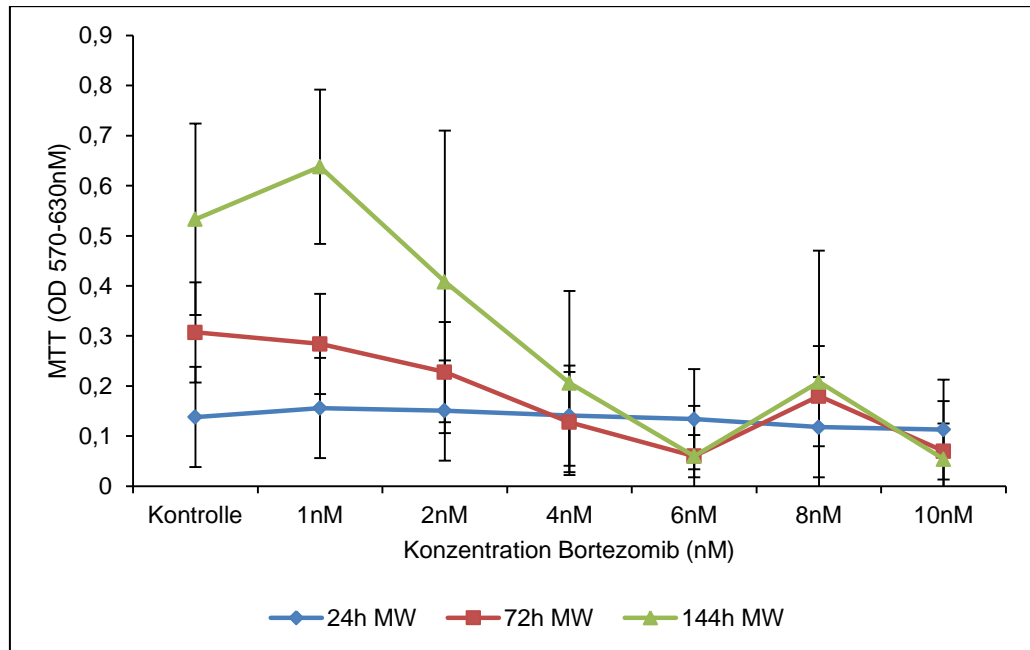


Abbildung 10 : Zeit- und dosisabhängige Zellzahlreduktion der Zelllinien TPC1 mit und ohne Bortezomibbehandlung.

Dargestellt ist die kolorimetrische Messung lebender Zellen mittels MTT-Assay: Mittelwert aus 3 Versuchsreihen mit jeweils Dreifachbestimmungen. Abgebildet sind Messwerte nach 24, 72 und 144 Stunden Inkubation mit Bortezomib als Mittelwerte optischer Dichtewerte mit jeweiliger Standardabweichung. Kontrolle: Mit DMSO (Trägerlösung) behandelte Zellen.

a)



b)

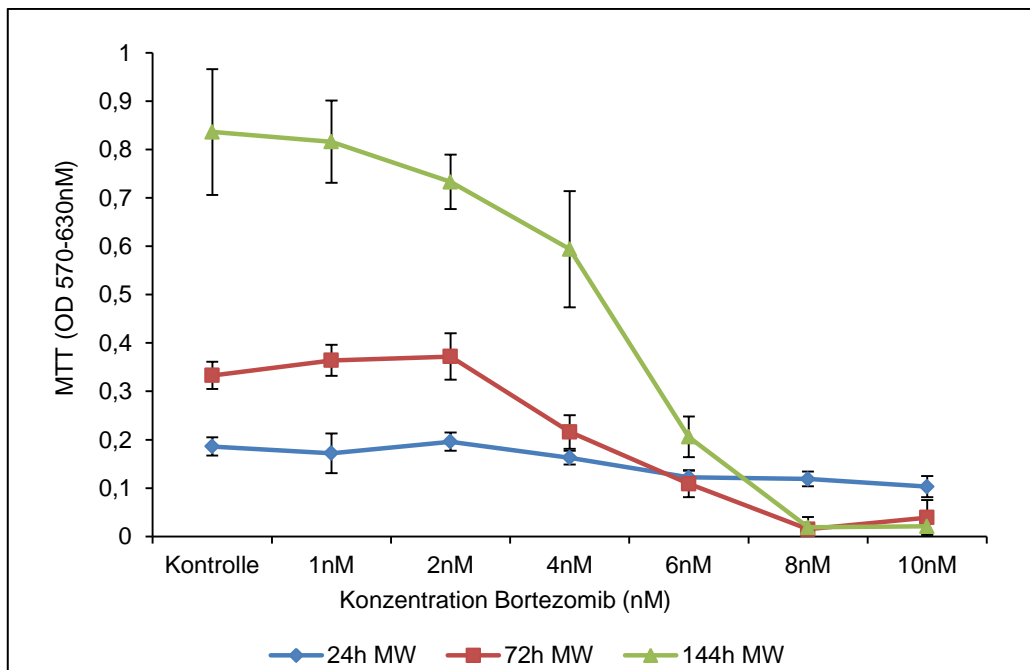
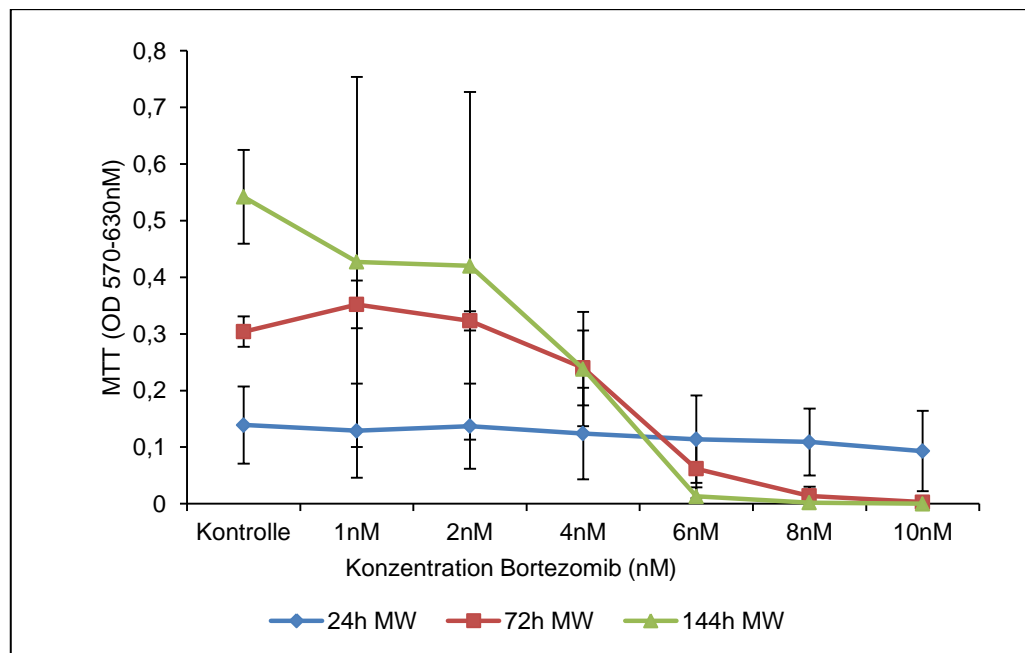


Abbildung 11: Zeit- und dosisabhängige Zellzahlreduktion der Zelllinien a) FTC133 (follikulär) und b) Zelllinie Hth74 (anaplastisch) mit und ohne Bortezomibbehandlung.

Dargestellt ist die kolorimetrische Messung lebender Zellen mittels MTT-Assay: Mittelwert aus 3 Versuchsreihen mit jeweils Dreifachbestimmungen. Abgebildet sind Messwerte nach 24, 72 und 144 Stunden. Inkubation mit Bortezomib als Mittelwerte optischer Dichtewerte mit jeweiliger Standardabweichung. Kontrolle: mit DMSO (Trägerlösung) behandelte Zellen.

a)



b)

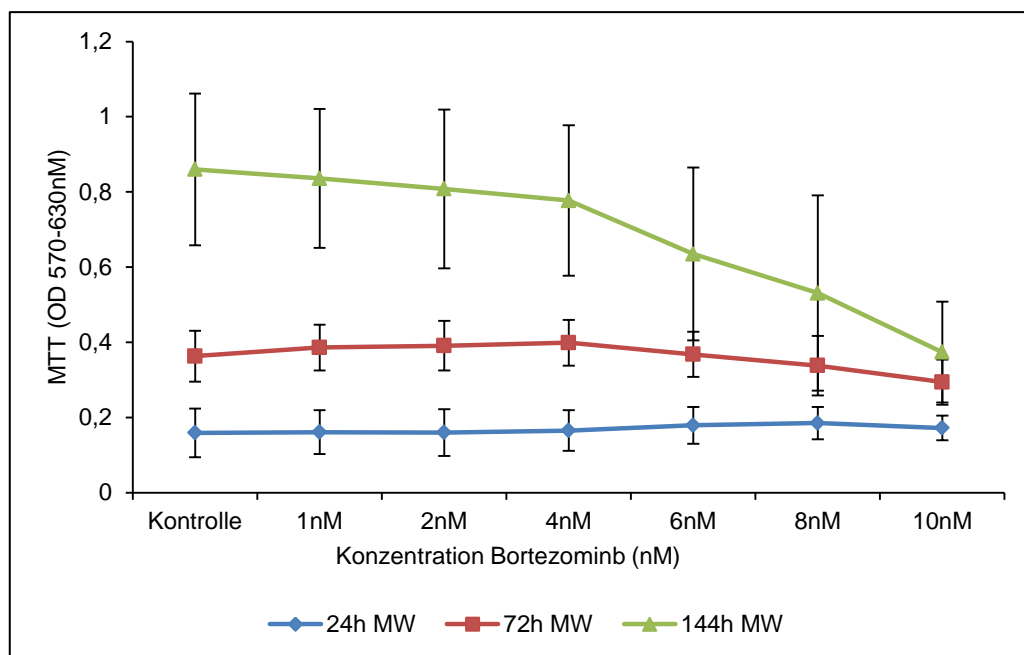


Abbildung 12: Zeit- und dosisabhängige Zellzahlreduktion der Zelllinien a) C643 (anaplastisch) und b) Kat4 (anaplastisch) mit und ohne Bortezomibbehandlung.

Dargestellt ist die kolorimetrische Messung lebender Zellen mittels MTT-Assay: Mittelwert aus 3 Versuchsreihen mit jeweils Dreifachbestimmungen. Abgebildet sind Messwerte nach 24, 72 und 144 Stunden. Inkubation mit Bortezomib als Mittelwerte optischer Dichtewerte mit jeweiliger Standardabweichung. Kontrolle: mit DMSO (Trägerlösung) behandelte Zellen.

Die Abbildungen 10-12 verdeutlichen, wie bereits zuvor erwähnt, eine sowohl zeit- als auch dosisabhängige Reduktion der Zellzahl. Bei allen fünf Zelllinien zeigt sich bei einer Inkubationszeit von 24 Stunden kaum ein Effekt auf die Zellzahl. Die Werte der optischen Dichte, durch die sich indirekt auf die Zellzahl rückschließen lässt, sind nahezu identisch. Beispielsweise weist die Kontrolle der Zelllinie TPC1 eine optische Dichte von 0,14 auf und dieselbe Inkubationszeit mit 10 nM Bortezomib ergibt eine optische Dichte von 0,144. Es fand demnach keine Zellzahlreduktion statt. Nach 72 Stunden Inkubationszeit zeigen sich bereits deutlichere Effekte auf die Zellzahl hinsichtlich einer Reduktion, die ungefähr mit denen nach einer Inkubationszeit von 144 Stunden übereinstimmen. Beispielsweise zeigt die Zelllinie C643 ab einer Konzentration von 2 nM eine deutliche Reduktion der Zellzahl auf, sowohl nach 144 als auch 72 Stunden Inkubationszeit. Die Zelllinien TPC1, Hth74 und Kat4 weisen dies ab einer Konzentration von 4 nM Bortezomib auf. Bei der Zelllinie FTC133 lässt sich erstaunlicherweise eine zweiphasige Dosis-Wirkungskurve beobachten. So zeigte sich zwischen 6 nM und 8 nM ein erneuter Anstieg der Zellzahl.

Um den Vergleich der Effektivität in der Behandlung mit Bortezomib für die verschiedenen Zelllinien zu quantifizieren, wurden für den Endpunktmesswert nach 144 Stunden die IC_{50} -Werte berechnet, die im Folgenden genauer betrachtet werden sollen.

Die ermittelten IC_{50} -Werte als Maß zur Abschätzung der Sensitivität betrugen $2,6 \pm 1,9$ nM für die Zelllinie C643, $3,6 \pm 0,7$ nM für die Zelllinie FTC133, $4,6 \pm 0,1$ nM für die Zelllinie Hth74, $8,1 \pm 2,6$ nM für die Zelllinie TPC1 und $11,9 \pm 2,1$ nM für die Zelllinie Kat4. Demnach reagierte die anaplastische Zelllinie C643 am Sensitivsten auf die Behandlung mit Bortezomib, gefolgt von der follikulären Zelllinie FTC133. Die anaplastische Zelllinie Kat4 wies die geringste Sensitivität auf.

Damit beeinflusst Bortezomib die Zellviabilität aller untersuchten Histiotypen des Schilddrüsenkarzinoms mit IC_{50} -Werten zwischen 2 nM-12 nM.

Unter anderem zur Veranschaulichung der antiproliferativen Effekte Bortezomibs wurde die prozentuale Reduktion der Zellzahl unter Bortezomib nach einem Messzeitpunkt von 144 h für die einzelnen Konzentrationen berechnet und synoptisch in der Abbildung 13 dargestellt. An den berechneten Werten bei einer Konzentration von 10 nM (maximal eingesetzte Konzentration) kann exemplarisch am deutlichsten die antiproliferative Wirkung Bortezomibs auf die untersuchten Zelllinien dargestellt werden. So lag die prozentuale Reduktion der Zellzahl bei der Zelllinie C643

(anaplastisch) bei 100 %, gefolgt von der Zelllinie Hth74 (anaplastisch) mit 98% und FTC133 (follikulär) mit 95 %. Bei der papillären Zelllinie TPC1 zeigte sich eine Reduktion der Zellzahl um 70 % und die anaplastische Zelllinie Kat4 wies eine Reduktion um 50 % auf. Des Weiteren sind die jeweiligen Signifikanzniveaus angegeben.

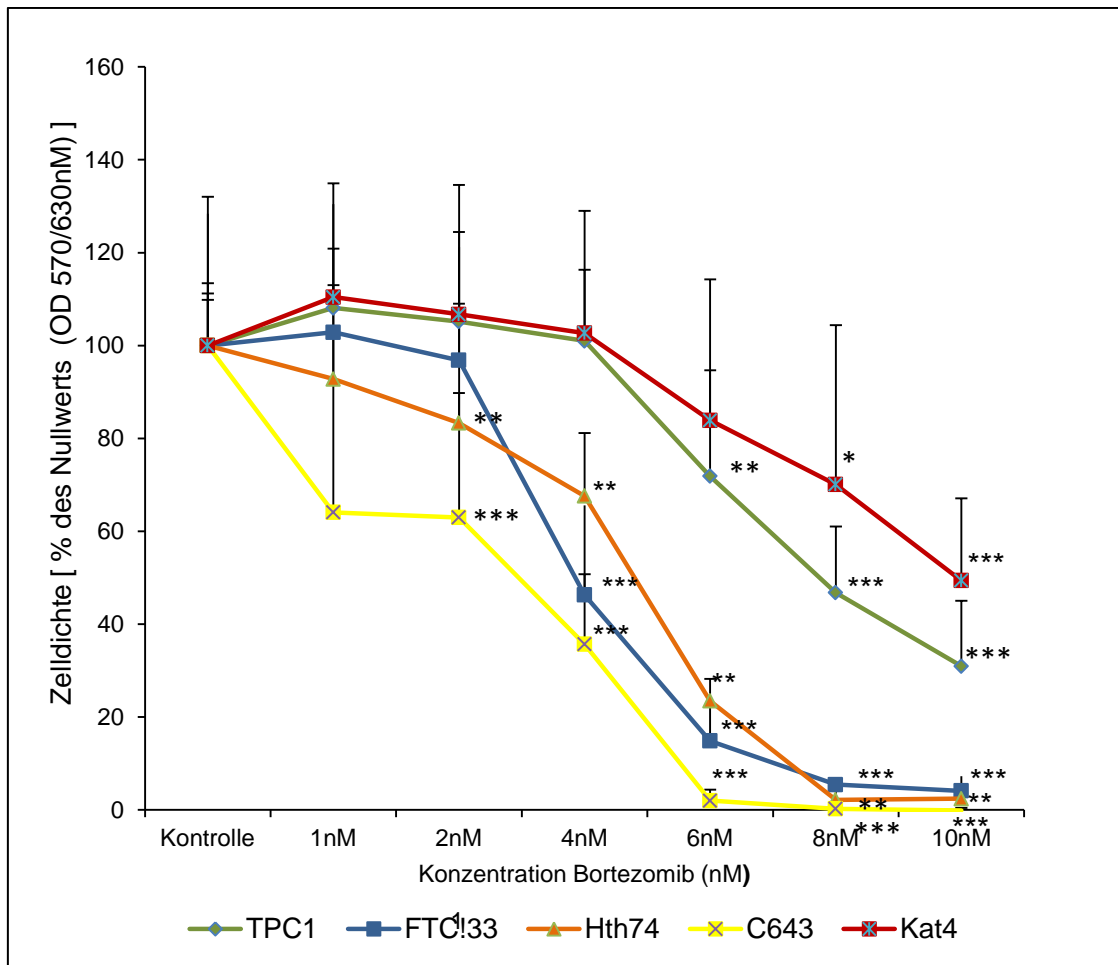


Abbildung 13: Übersicht: Effekt von Bortezomib auf die Zellproliferation nach 144 Stunden

Kolorimetrische Messung lebender Zellen mittels MTT-Assay: Mittelwert aus 3 Versuchsreihen mit jeweils Dreifachbestimmungen. Abgebildet sind Endpunktmesswerte nach 144 Stunden Inkubation mit Bortezomib als prozentuale Zellzahlreduktion im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen mit jeweiliger Standardabweichung. Dargestellt sind die Zelllinien TPC1 (papillär), FTC133 (follikulär), Hth74, C643 und Kat4 (anaplastisch) Kontrolle: mit DMSO (Trägerlösung) behandelte Zellen. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ und *** $P < 0,001$ nach Wilcoxon rank-sum Test.

3.2 Ergebnisse zur Caspase-3-Aktivität

Mit dem lumineszenzbasierten CaspaseGLO^R3/7 Assay wurde die Aktivitätssteigerung der Caspase-3 mit und ohne Stimulation durch Bortezomib für die Zelllinien TPC1, FTC133, Hth74, C643 und Kat4 untersucht. Bortezomib wurde dabei in steigenden Endkonzentrationen (5 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM) aufgetragen und die Zellen für 24 Stunden inkubiert.

Um die tatsächliche Steigerung der Caspase-Aktivität für die einzelnen Zelllinien aufzeigen zu können, wurde auch die basale Caspase-Aktivität der Zelllinien durch eine Negativkontrolle (DMSO + Medium + Zellen + Reagenz) eruiert. Zusätzlich wurde mittels einer Blank-Kontrolle (DMSO + Medium + Reagenz) die Hintergrund-Lumineszenz festgestellt.

Der Blankwert wurde von den einzelnen gemessenen Lumineszenzwerten subtrahiert. Die Aktivitätssteigerung der Caspase ist in der Abbildung 14 als Faktoränderung im Verhältnis zur Negativkontrolle abgebildet. Zusätzlich sind die Signifikanzniveaus dargestellt.

Ersichtlich ist über eine 24stündige Inkubation mit Bortezomib eine dosis- und zelllinienabhängige Aktivitätssteigerung von Caspase-3.

Zwischen 10 nM und 50 nM Bortezomib ist die Aktivitätssteigerung der Caspase-3 bei den meisten Zelllinien am größten. So beispielsweise bei der Zelllinie TPC1 mit einem Anstieg um das 4,5 fache und der Zelllinie Kat4 um das 3 fache. Zwischen 50 nM und 100 nM hingegen ist der Aktivitätsanstieg wesentlich geringer und weist bei der Zelllinie Hth74 sogar einen leichten Rückgang auf. Dies könnte auf die durch Bortezomib in diesen Konzentrationsbereichen teilweise bereits toxische Wirkung zurückzuführen sein.

Dennoch sollen im Folgenden zur Darstellung und Vergleichbarkeit der Änderung der Caspase-3-Aktivität der einzelnen Zelllinien, die Faktoren bei der Endkonzentration von 100 nM herangezogen werden. Es kam zu einer signifikanten ($p < 0,01$) Aktivitätssteigerung, die zelllinienabhängig um den Faktor 8 und 20 variierte. Als Referenz galt die Negativkontrolle bei 100 nM Bortezomib.

Die stärkste Aktivitätssteigerung zeigte die Zelllinie TPC1 mit dem Faktor 20. Die Zelllinie FTC133 hingegen zeigte lediglich eine Zunahme um den Faktor 8. Von den drei anaplastischen Zelllinien war die Aktivitätssteigerung der Caspase-3-Aktivität der

Zelllinie C643 mit dem Faktor 17 und Hth74 mit dem Faktor 16 stärker als bei der Zelllinie Kat4 mit dem Faktor 9,9.

Alle untersuchten Zelllinien wiesen eine signifikante Aktivitätssteigerung der Caspase-3 unter Bortezomibbehandlung auf.

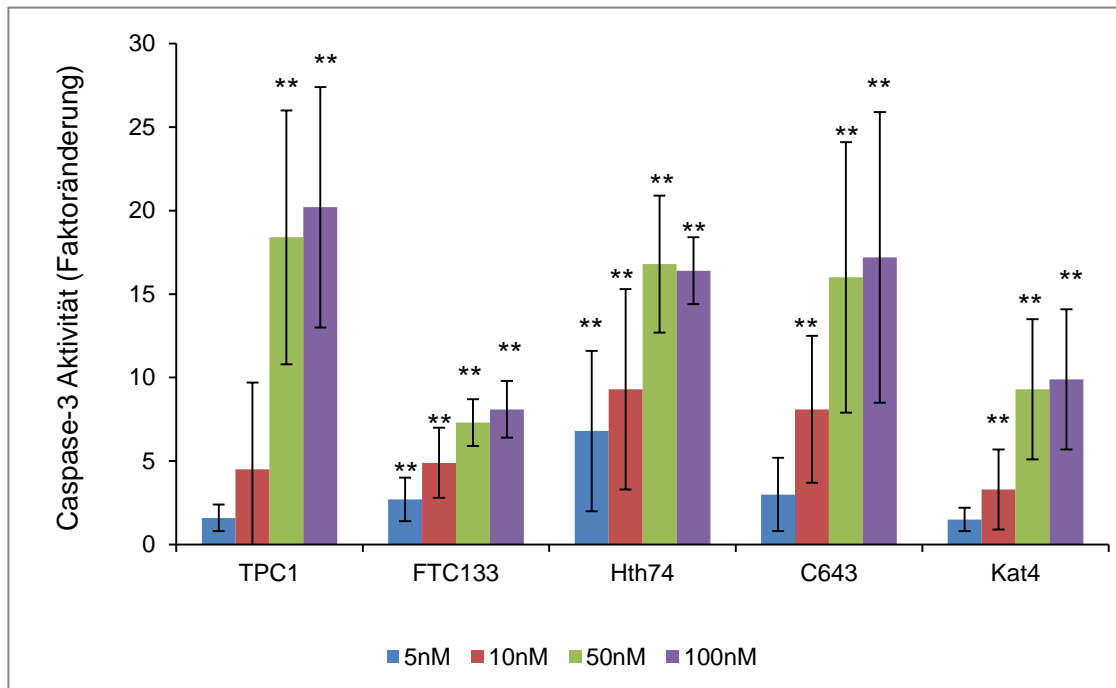


Abbildung 14: In vitro Effekte von Bortezomib auf die Caspase-3-Aktivität

Lumineszenzbasierte Messung mittels CaspaseGLO^R 3/7 Assay der Caspase-3-Aktivität von Schilddrüsenzellen nach 24 Stunden Inkubation mit und ohne Stimulation von Bortezomib sowie DMSO (Trägerlösung) als Kontrolle. Die Caspaseaktivität wurde bestimmt und die Faktoränderung dieser verglichen mit der DMSO-Kontrolle für die Zelllinien TPC1, FTC133, Hth74, C643 und Kat4 dargestellt. Die Daten entstammen 3 Versuchsreihen mit jeweils Zweifachbestimmungen, Mittelwerte mit SD sind dargestellt.

**P<0,01 nach dem Wilcoxon rank-sum Test.

3.3 Ergebnisse zum Apoptose Array

Die Behandlung von Zellen mit Bortezomib führt unter anderem über verschiedene molekulare Signalwege zum apoptotischen Zelltod (s. Abschnitt 1.3.3).

Um Hinweise auf die Beeinflussung apoptoseassoziiierter Proteine unter Bortezomib-einwirkung zu erhalten, wurden die Schilddrüsenzelllinien TPC1, FTC133, Hth74, C643 und Kat4 mit dem Humanen Apoptose Array Kit analysiert.

Der Humane Apoptose Array Kit basiert auf dem ELISA-Verfahren (s. Abschnitt 2.2.4.2). Mit ihm lässt sich die relative Expression von 35 apoptoseassoziierten Proteinen nachweisen. Die oben genannten Schilddrüsenzelllinien wurden für 24 Stunden mit 100 nM Bortezomib inkubiert. Die Auswertung erfolgte durch das Auflegen einer transparenten Auflage auf die entwickelte Membran, die jedem Protein eine Koordinate zuweist (s. Abschnitt 2.2.4.3). Die Identifizierung der einzelnen Proteine war darauf mittels einer Appendix möglich. Im Folgenden ist exemplarisch das Ergebnis des Humanen Apoptose Arrays für die Zelllinie Hth74 dargestellt (s. Abbildung 15) sowie die Appendix (s. Abbildung 16).

Diese Auswertung wurde für jede Zelllinie separat durchgeführt. Um eine bessere Übersicht über die Ergebnisse der einzelnen Zelllinien zu bekommen, wurden die Resultate in eine Tabelle eingetragen. Dabei lag der Fokus auf den durch Bortezomib beeinflussten Proteinen (s. Tabelle 1)

Von den getesteten proapoptotischen Proteinen wurde, wie erwartet, Caspase-3 von allen Zelllinien induziert und TRAIL R2/D5 bei vier von fünf Zelllinien (TPC1, Hth74, Kat4, C643). Die proapoptotischen Proteine betrachtend wurden außerdem bei drei von fünf Zelllinien folgende beeinflusst: die Proteine TRAIL R1/DR4, p21, p53 phospho (S46), p53 phospho (S392), p53 phospho (S15) bei den Zelllinien TPC1, Hth74 und Kat4 sowie HSP60 bei den Zelllinien Hth74, C643, Kat4. Bei zwei von fünf Zelllinien wurden folgende Proteine hochreguliert: das Protein FAAD bei den Zelllinien Hth74 und C643 sowie p27/KIP1 bei den Zelllinien Hth74 und Kat4. Für die Proteine Bax, Cytochrom c und FAS fand bei keiner der Zelllinien eine Induktion statt. Überraschenderweise wurden die proapoptotischen Proteine, bis auf Caspase-3, bei der Zelllinie FTC133, herunterreguliert.

Neben den proapoptotischen wurden auch antiapoptotisch wirkende Proteine durch Induktion stabilisiert. Hier wiesen alle Zelllinien eine Induktion von HIF-1 alpha und

Claspin auf. Eine Induktion von HO-1 Proteinen fand bei drei von fünf Zelllinien statt (TPC1, Kat4, C643) wie auch für die XIAP-Proteine (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) (Kat4, Hth74, C643). HSP70 wurde von zwei Zelllinien hochreguliert (TPC1, Hth74). Eine Herunterregulation antiapoptotischer Proteine zeigte lediglich die Zelllinie FTC133 für XIAP und HSP 70.

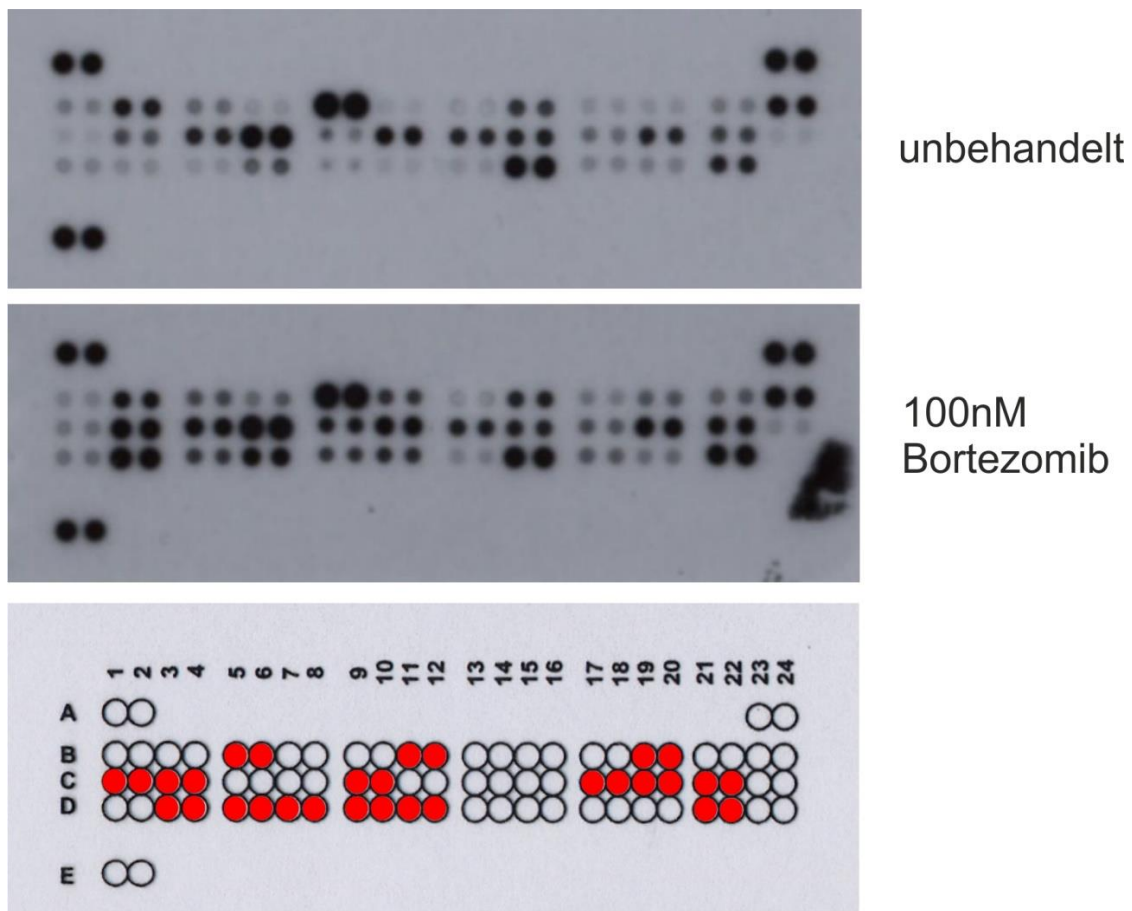


Abbildung 15: Effekte von Bortezomib auf apoptoseassoziierte Proteine der Zelllinie Hth74

Evaluierung der Effekte von Bortezomib mittels Humanem Apoptose Array Kit auf die Zelllinie Hth74 bei einer Inkubation von 24 Stunden ohne und mit 100 nM Bortezomibbehandlung.

Abgebildet sind die entwickelten Membranen des Arrays sowie die modifizierte transparente Auflage zum Auswerten der Proteine. Legende: ausgefüllt rote Kreise: Veränderungen im Sinne einer Hochregulation der Proteine bei 100 nM Bortezomib im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Leere Kreise: keine Veränderung der abgebildeten Intensität zwischen unbehandelten und behandelten Zellen.

Identifizierung der Proteine mittels Appendix (s. Abbildung 16) möglich.

Coordinate	Target/Control	Coordinate	Target/Control
A1, A2	Positive Control	C13, C14	HO-2/HMOX2
A23, A24	Positive Control	C15, C16	HSP27
B1, B2	Bad	C17, C18	HSP60
B3, B4	Bax	C19, C20	HSP70
B5, B6	Bcl-2	C21, C22	HTRA2/Omi
B7, B8	Bcl-x	C23, C24	Livin
B9, B10	Pro-Caspase-3	D1, D2	PON2
B11, B12	Cleaved Caspase-3	D3, D4	p21/CIP1/CDNK1A
B13, B14	Catalase	D5, D6	p27/Kip1
B15, B16	clAP-1	D7, D8	Phospho-p53 (S15)
B17, B18	clAP-2	D9, D10	Phospho-p53 (S46)
B19, B20	Claspin	D11, D12	Phospho-p53 (S392)
B21, B22	Clusterin	D13, D14	Phospho-Rad17 (S635)
B23, B24	Cytochrome c	D15, D16	SMAC/Diablo
C1, C2	TRAIL R1/DR4	D17, D18	Survivin
C3, C4	TRAIL R2/DR5	D19, D20	TNF R1/TNFRSF1A
C5, C6	FADD	D21, D22	XIAP
C7, C8	Fas/TNFSF6	D23, D24	PBS (Negative Control)
C9, C10	HIF-1 α	E1, E2	Positive Control
C11, C12	HO-1/HMOX1/HSP32		

Abbildung 16: Appendix zur Auswertung des Humanen Apoptose Array Kits mittels transparenter Auflage.
Dargestellt sind die Koordinaten und die dazugehörigen Proteine.

Zelllinie						
Protein	TPC1	FTC133	Hth74	C643	Kat4	Protein - Induktion in X von 5 ZL
proapoptotisch						
Bad	(-)	-		-	(+)	1
Bax	(-)	(-)		-		
Cleaved Caspase 3	(+)	++	++	++	++	5
Cytochrom c		-				
TRAIL R1/DR4	++	-	+	(-)	++	3
TRAIL R2/DR5	++		++	++	++	4
FAAD	(-)		(+)	(+)		2
FAS/TNFSF6						
HSP 60		-	(+)	+	+	3
p21/CIP/CDNK1A	++	-	++		+	3
p27/KIP1		-	++		(+)	2
phospho p53 (S15)	++	-	++		+	3
phospho p53 (S46)	++	--	++		+	3
phospho p53 (S392)	++	--	++		+	3
Induktion/ Protein	7	1	10	4	10	

Tabelle 1: Zusammenfassung der Effekte von Bortezomib auf proapoptotische Proteine in vitro mittels Humanem Apoptose Array

Dargestellt sind die Zelllinien TPC1, FTC133, Hth74, C643 und Kat4 und die jeweiligen Veränderungen der Proteine im Vergleich: unbehandelte Zellen zu mit 100 nM Bortezomib stimulierten Zellen.

Legende: Induktion der Proteine: (+) schwach, + mittel, ++ stark

Herunterregulation der Proteine: (-) schwach, - mittel, -- stark durch den Humanen Apoptose Array ermittelt und durchgeführt wie im Material- und Methodenteil Abschnitt 2.2.4 beschrieben.

Zelllinie						
Protein	TPC1	FTC133	Hth74	C643	Kat4	Protein - Induktion in X von 5 ZL
antiapoptotisch						
Bcl 2					(+)	1
Claspin	+	+	+	(+)	++	5
HIF-1alpha	+	+	(+)	(+)	+	5
HO-1/HMOX/HSP32	+			+	++	3
<i>HSP 27</i>		–				
HSP 70			+		(+)	2
XIAP		–	(+)	(+)	(+)	3
Induktion/Protein	3	2	4	4	6	

Tabelle 2: Zusammenfassung der Effekte von Bortezomib auf antiapoptotische Proteine in vitro mittels Humanem Apoptose Array

Dargestellt sind die Zelllinien TPC1, FTC133, Hth74, C643 und Kat4 und die jeweiligen Veränderungen der Proteine im Vergleich: unbehandelte Zellen zu mit 100 nM Bortezomib stimulierten Zellen.

Legende: Induktion der Proteine: (+) schwach, + mittel, ++ stark

Herunterregulation der Proteine: (–) schwach, – mittel, – – stark durch den Humanen Apoptose Array ermittelt und durchgeführt wie im Material- und Methodenteil Abschnitt 2.2.4 beschrieben.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass bei allen Zelllinien die proapoptotischen Proteine betrachtend, vor allem eine Induktion von Caspase-3 und TRAIL R2/DR5 stattgefunden hat. Darüber hinaus wurden auch die Proteine p21/CIP/CDNK1A, phospho p53 (S15), phospho p53 (S46), phospho p53 (S392) bei drei der fünf untersuchten Zelllinien stark hochreguliert. Diese Beobachtung stimmt mit der Theorie überein, dass p53 sowohl p21 als auch in höheren Dosen die Caspasen induziert.

Von den antiapoptotischen Proteinen wurden vor allem Claspin und HIF-1alpha schwach induziert.

Vergleicht man die Ergebnisse der verschiedenen Zelllinien so zeigt sich, dass vor allem bei den Zelllinien Hth74 und TPC1 die proapoptotischen Effekte überwiegen, sowohl in Bezug auf die Anzahl (7 und 9 von 14 Proteinen) als auch auf die Induktionsintensität

der proapoptotischen Proteine und eine Verschiebung der Balance hin zu den proapoptotischen Proteinen stattfindet. Ebenso weist die Zelllinie Kat4 eine Induktion von 9 von insgesamt 14 proapoptotischen Proteinen auf, zugleich allerdings auch eine vermehrte und stärkere Induktion antiapoptotischer Proteine (6 von 8). Die Zelllinie C643 reagierte insgesamt mit einer schwachen Intensität die Induktion pro- und antiapoptischer Proteine betreffend. Bei der Zelllinie FTC133 bewirkte Bortezomib überraschenderweise, im Gegensatz zu allen anderen Zelllinien, eine Herunterregulierung der proapoptotischen Proteine bis auf Caspase-3 und es kam zu einer Verschiebung der Balance zwischen anti- und proapoptotischen Proteinen hin zu den antiapoptotischen Proteinen.

3.4 Ergebnisse der Zellzyklusanalyse

Aufgrund der Annahme, dass Bortezomib die Regulation des Zellzyklus durch einen G2/M-Arrest beeinflusst, wurde bei den Zelllinien TPC1 (papillär), FTC133 (follikulär) und den anaplastischen Zelllinien Hth74, C643 und Kat4 mit und ohne Bortezomibbehandlung eine Zellzyklusanalyse durchgeführt. Die Zellzyklusanalyse der Schilddrüsenzelllinien fand mittels Durchflusszytometrie mit dem Gerät LSRII (BD) nach Propidiumiodid-Färbung statt. Die Zelllinien wurden für 24 Stunden sowohl unbehandelt als auch mit 10 nM und 20 nM Bortezomib inkubiert. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnten der DNA-Gehalt der einzelnen Zellen erkannt und die Anzahl der Zellen in der G1-, S- und G2/M-Phase prozentual mit der Systemsoftware Cellquest PRO errechnet werden.

In den folgenden Abbildungen 17-19 ist exemplarisch die Auswertung der Zelllinie FTC133 sowohl der unbehandelten als auch mit 10 nM und 20 nM Bortezomib stimulierter Zellen abgebildet.

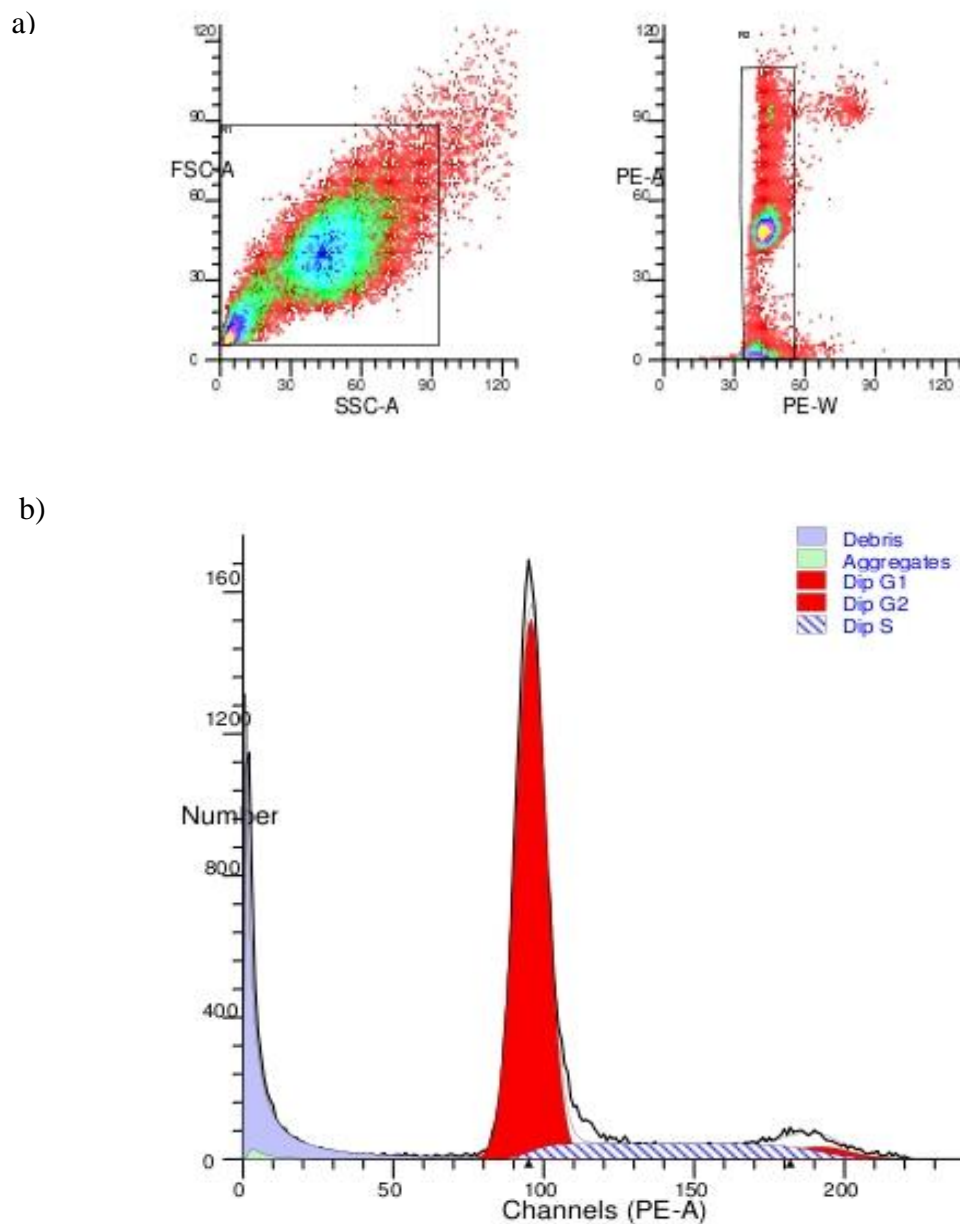


Abbildung 17: Zellzyklusanalyse der Zelllinie FTC133 mittels LSRII (BD) und Auswertung der Daten mit der Systemsoftware CellQuest PRO(BD)

Dargestellt sind die Daten der Zellzyklusanalyse von FTC133 als zweidimensionales Punktdiagramm (*dot-plots*) und eindimensionales Histogramm. Nach Setzen des Analysefensters auf die zu analysierende Zellpopulation nach FSC/SSC Eigenschaften erfolgte die Auswertung.

a+b) Zelllinie FTC133, 24h Inkubation unbehandelter Zellen nach PI-Färbung (50µg/ml PI, 200µg/mlRNase) dargestellt als Punktdiagramm (a) und Histogramm (b)

Legende: FSC-A: Vorwärtsstreulicht, SSC-A: Seitwärtsstreulicht, PE-A: Phycoerythrin-Area, PE-W: Phycoerythrin-Width

Histogramm: x-Achse: totale Fluoreszenz y-Achse: Zellzahl Debris: Zelldebris Aggregates: aggregierte Zellen

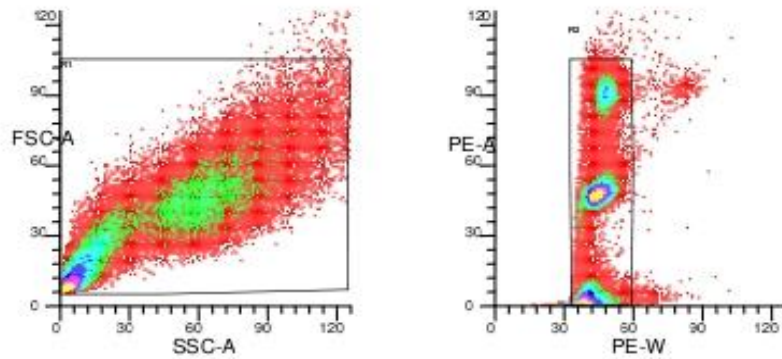
DipG1: Zellen in der G1-Phase

DipG2: Zellen in der G2-Phase

DipS: Zellen in der S-Phase

b) DipG1: 79,64% DipG2: 3,68

c)



d)

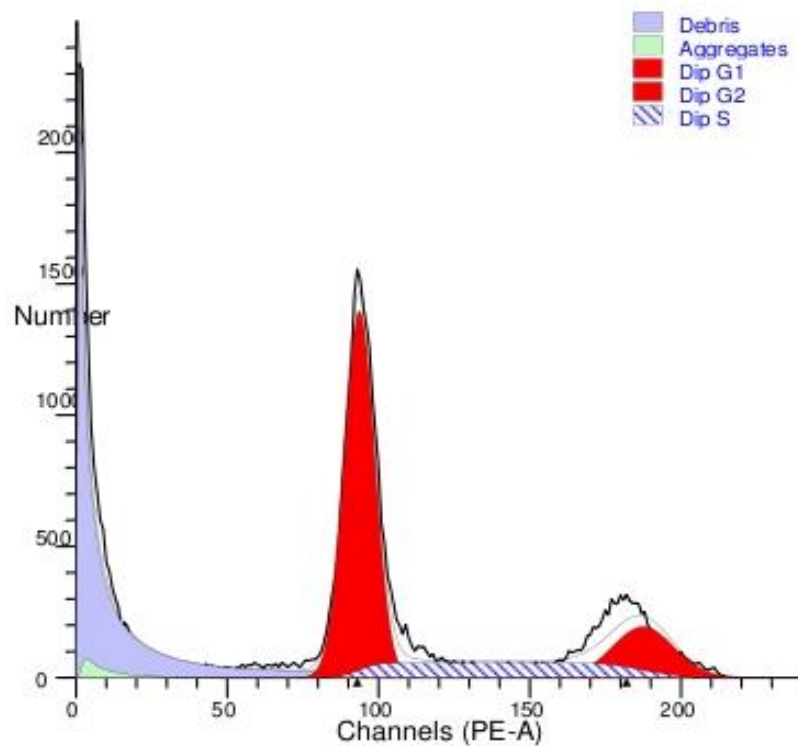


Abbildung 18: Zellzyklusanalyse der Zelllinie FTC133 mittels LSRII (BD) und Auswertung der Daten mit der Systemsoftware CellQuest PRO(BD)

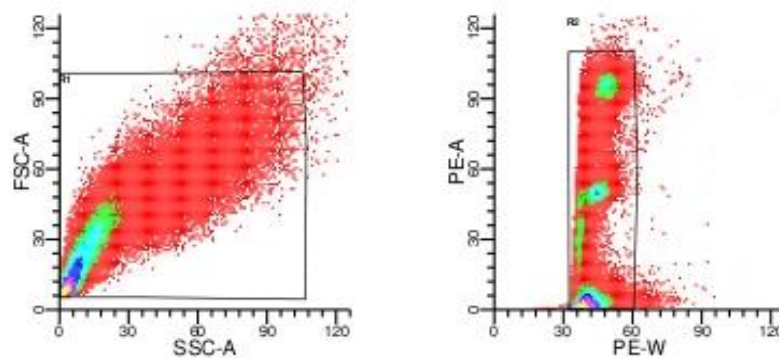
Dargestellt sind die Daten der Zellzyklusanalyse von FTC133 als zweidimensionale Punktdiagramme (*dot-plots*) und eindimensionale Histogramme. Nach Setzen des Analysefensters auf die zu analysierende Zellpopulation nach FSC/SSC Eigenschaften erfolgte die Auswertung.

c+d) Zelllinie FTC133, 24h Inkubation mit 10 nM behandelte Zellen nach PI-Färbung (50µg/mlPI, 200 µg/mlRNase) dargestellt als Punktdiagramm (c) und Histogramm (d)

Legende: FSC-A: Vorwärtstreulicht, SSC-A: Seitwärtstreulicht, PE-A: Phycoerythrin-Area, PE-W: Phycoerythrin-Width

Histogramm: x-Achse: totale Fluoreszenz y-Achse: Zellzahl Debris: Zelldebris Aggregates: aggregierte Zellen
 DipG1: Zellen in der G1-Phase DipG2: Zellen in der G2-Phase DipS: Zellen in der S-Phase
 d) DipG1: 63,48% DipG2: 17,55%

e)



f)

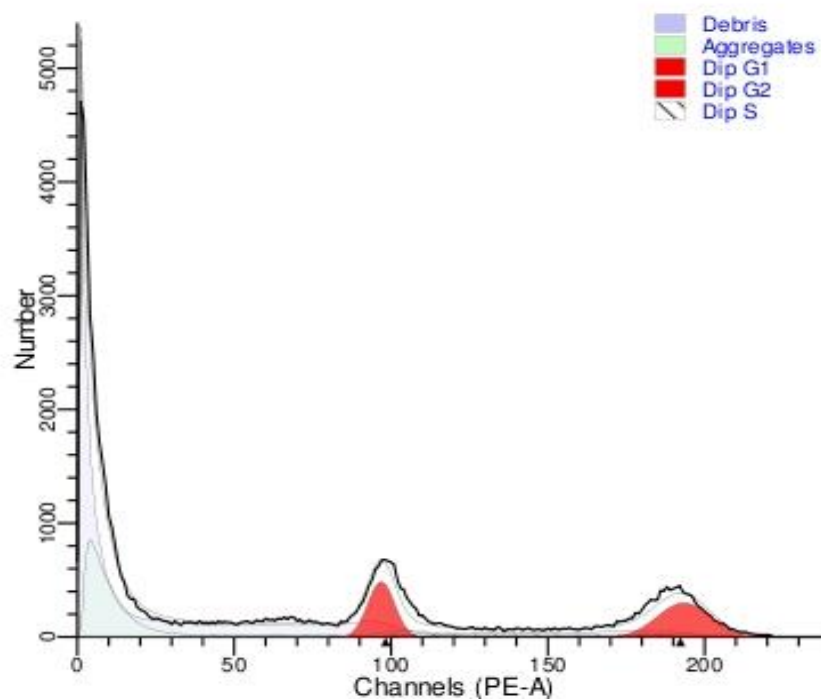


Abbildung 19: Zellzyklusanalyse der Zelllinie FTC133 mittels LSRII (BD) und Auswertung der Daten mit der Systemsoftware CellQuest PRO(BD)

Dargestellt sind die Daten der Zellzyklusanalyse von FTC133 als zweidimensionale Punktdiagramme (*dot-plots*) und eindimensionale Histogramme. Nach Setzen des Analysefensters auf die zu analysierende Zellpopulation nach FSC/SSC Eigenschaften erfolgte die Auswertung.

e+f) Zelllinie FTC133, 24h Inkubation mit 20 nM behandelte Zellen nach PI-Färbung (50 µg/ml PI, 200 µg/mlRNase) dargestellt als Punktdiagramm (e) und Histogramm (f)

Legende: FSC-A: Vorwärtsstreulicht, SSC-A: Seitwärtsstreulicht, PE-A: Phycoerythrin-Area PE-W: Phycoerythrin-Width

Histogramm: x-Achse: totale Fluoreszenz y-Achse: Zellzahl Debris: Zelldebris Aggregates: aggregierte Zellen
DipG1: Zellen in der G1-Phase DipG2: Zellen in der G2-Phase DipS: Zellen in der S-Phase
f)DipG1: 36,98% DipG2: 45,78%

Zur besseren Übersicht wurden die prozentual errechneten Werte tabellarisch dargestellt (s. Tabelle 3) und sollen im Folgenden erläutert werden. Zelllinien- und dosisabhängig ließ sich eine Akkumulation von Zellen in der G2/M-Phase bei korrespondierender Abnahme der Zellzahl in der G1-Phase beobachten. Es fand ein Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase von bis zu 50 % nach Behandlung mit 20 nM Bortezomib und 24 stündiger Inkubation statt. Die Werte der Kontrollzellen ohne Bortezomibstimulation lagen bei drei von fünf Zelllinien hingegen <5 %. Der größte Effekt zeigte sich in der follikulären Zelllinie FTC133 (follikulär) mit einem Arrest in der G2/M-Phase von 45,8 % bei Stimulation mit Bortezomib von 20 nM und 24 stündiger Inkubation. Die Kontrollzellen wiesen lediglich ein Arrest von 3,68 % auf. Ebenso zeigte sich in der anaplastischen Zelllinie C643 unter gleichen Bedingungen ein eindeutiger Effekt mit 55,6 % der behandelten Zellen in der G2/M-Phase gegenüber 14,9 % unbehandelten Zellen in der G2/M-Phase. Auch die anaplastische Zelllinie Hth74 wies mit 26 % der behandelten Zellen in der G2/M-Phase gegenüber 4,09 % unbehandelten Zellen in der G2/M-Phase einen deutlichen Unterschied auf. Die anaplastische Zelllinie Kat4 zeigte im Vergleich ein geringeres Ansprechen auf Bortezomib mit Werten von 18,7 % der mit 20 nM behandelten Zellen in der G2/M-Phase gegenüber 2,4 % der unbehandelten Zellen in der G2/M-Phase. Überraschenderweise zeigte die papilläre Zelllinie TPC1 keine Veränderung des DNA-Profiles unter Behandlung mit Bortezomib. Hier fanden sich unabhängig von der Behandlung ca. 63 % der Zellen in der G2/M-Phase.

Zusammenfassend ließ sich unter Bortezomibstimulation ein Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase bis zu 50 % (FTC133) verzeichnen. Dies könnte vielleicht eine Erklärung für den rasanten Abfall der FTC133 Zellpopulation in der Proliferation sein (s. Abbildung 11). Lediglich bei der Zelllinie TPC1 ließ sich unter Bortezomib kein Effekt erkennen.

Zelllinie	Phase des Zellzyklus	Unbehandelt	10 nM	20 nM
TPC1	G1	31,68%	30,75%	30,64%
	G2	63,92%	65,81%	63,94%
FTC133	G1	79,64%	63,48%	36,98%
	G2	3,68%	17,55%	45,78%
Hth74	G1	89,72%	86,30%	54,75%
	G2	4,09%	13,70%	26,04%
C643	G1	59,13%	27,63%	16,03%
	G2	14,88%	50,58%	55,61%
Kat4	G1	83,38%	84,96%	69,94%
	G2	1,27%	5,21%	18,68%

Tabelle 3: G2/M-Arrest induziert durch Bortezomib in den Zelllinien TPC1, FTC133, HTh74, C643 und Kat4

Dargestellt sind die oben genannten Schilddrüsenzelllinien sowohl unbehandelt als auch stimuliert mit 10 nM und 20 nM Bortezomib bei einer Inkubation von 24 Stunden. Die Werte wurden durchflusszytometrisch nach PI-Färbung mit LSRII (BD) analysiert und repräsentieren die Werte eines Experiments.

3.5 Ergebnisse zur NFκB-Aktivität

Unter Behandlung mit Bortezomib wird eine Abnahme der Aktivität des Transkriptionsfaktors NFκB durch Inhibierung des Proteasoms und folgendem verminderten Abbau des inhibitorischen-κBs angenommen (s. Abschnitt 1.3.3). Mit dem ELISA basierten trans-AM NFκB p65 Assay wurde zunächst die basale NFκB DNA-Bindungsaktivität der Zelllinien TPC1, FTC133, Hth74, C643 und Kat4 bestimmt. Um Hinweise auf eine mögliche Veränderung der NFκB-Aktivität unter Bortezomibwirkung zu bekommen, wurde im Anschluß daran die NFκB-Aktivität nach Stimulation mit 10 nM, 50 nM und 100 nM Bortezomib und 24 Stunden Inkubation eruiert.

Zunächst konnte für alle untersuchten Zelllinien unter Bortezomib eine basale NFκB DNA-Bindungsaktivität nachgewiesen werden, die zelllinienabhängig unterschiedlich stark ausgeprägt war und in Abbildung 20 dargestellt ist. Die im Vergleich zur Assay internen Positivkontrolle stärkste basale Bindungsaktivität von NFκB zeigte die Zelllinie Kat4 mit einem Faktor von 2,02, gefolgt von der Zelllinie TPC1 mit einem Faktor von 1,66. Die geringste basale Bindungsaktivität erreichte FTC133 mit einem Faktor von 0,37 im Vergleich zur Positivkontrolle. Während die Zelllinien Hth74 mit einem Faktor von 1,10 und C643 mit einem Faktor von 0,87 im Mittelfeld lagen.

Zur Darstellung des Einflusses von Bortezomib auf die NFκB-Aktivität wurden prozentuale Veränderungen der mit Bortezomib behandelten Zellen bezogen auf die unbehandelten Kontrollen berechnet. Diese sind in Abbildung 21 mit den entsprechenden Signifikanzniveaus dargestellt und sollen im Folgenden besprochen werden.

Nach Behandlung mit 10 nM, 50 nM und 100 nM Bortezomib zeigte sich zelllinienabhängig entweder eine Minderung oder eine Steigerung der NFκB-DNA Bindungsaktivität oder die Zellen wurden kaum beeinflusst.

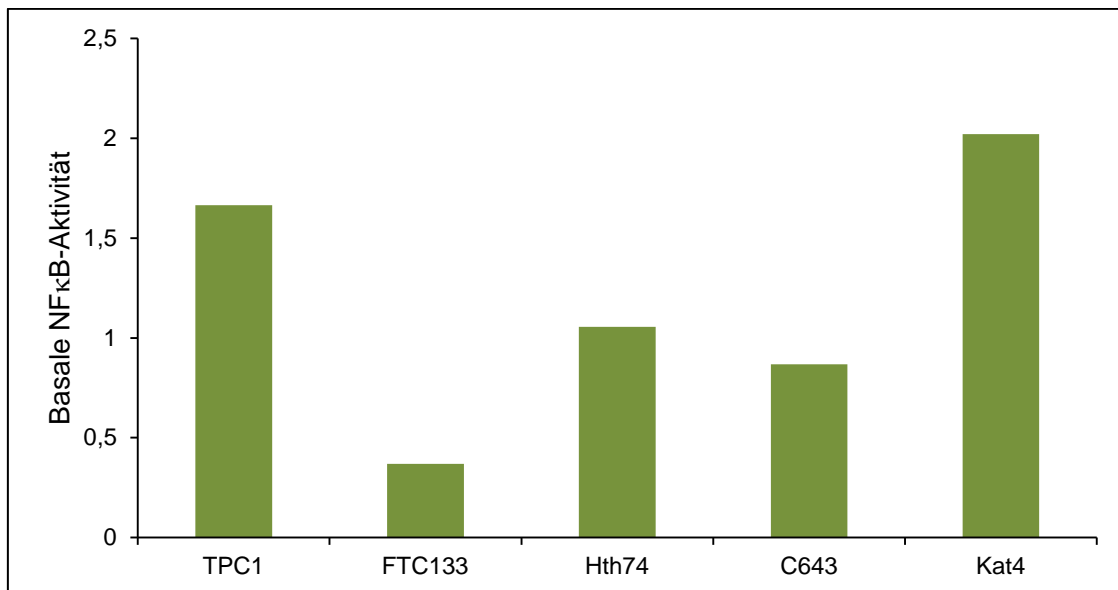


Abbildung 20: Basale NFκB-Aktivität der Schilddrüsenzelllinien in vitro

Dargestellt ist die Basisaktivität der Bindung des Transkriptionsfaktors NFκB an die DNA-Sequenz des ELISA basierten trans-AM NFκB p65 Transcription Factor Assays für die Zelllinien TPC1, FTC133, Hth74, C643 und Kat4. Angegeben ist der Faktor für die jeweilige Zelllinie im Vergleich zur Positivkontrolle.

Die Zelllinie Hth74 (anaplastisch) wies mit einer prozentualen Veränderung von 25 % bei 10 nM, 62 % bei 50 nM und 94 % bei 100 nM die größte, die Zelllinie TPC1 (papillär) hingegen mit 13 % bei 10 nM, 26 % bei 50 nM und 20 % bei 100 nM eine sehr viel geringere Steigerung der NFκB-DNA Bindungsaktivität auf. Unter Bortezomib-einfluss nahm sie bei der Zelllinie C643 kontinuierlich ab, sodass sie unter 100 nM Bortezomib um 47 % abgenommen hatte. Kaum beeinflusst durch Bortezomib wurden die Zelllinien FTC133 (follikuläre) und Kat4 (anaplastisch) in ihrer DNA-Bindungsaktivität von NFκB. So sank die NFκB Bindungsaktivität bei Kat4 bei 100 nM Bortezomib um 9 %. Bei der Zelllinie FTC133 nimmt die Aktivität zunächst unter 10 nM Bortezomibstimulation um 21 % zu, um dann wieder um 13 % zu sinken. Die bei allen Zelllinien, außer Hth74, festzustellende Abnahme der NFκB-DNA-Bindungsaktivität bei 100 nM resultiert vermutlich aus den in diesen Konzentrationen von Bortezomib bereits toxischen Auswirkungen auf die Zellen.

Zusammenfassend ergibt sich folglich lediglich für die Zelllinie Hth74 und TPC1 eine

Zunahme der NFκB-Bindungsaktivität, während sie bei der Zelllinie C643 abnimmt und bei den Zelllinien FTC133 und Kat4 kaum beeinflusst wird.

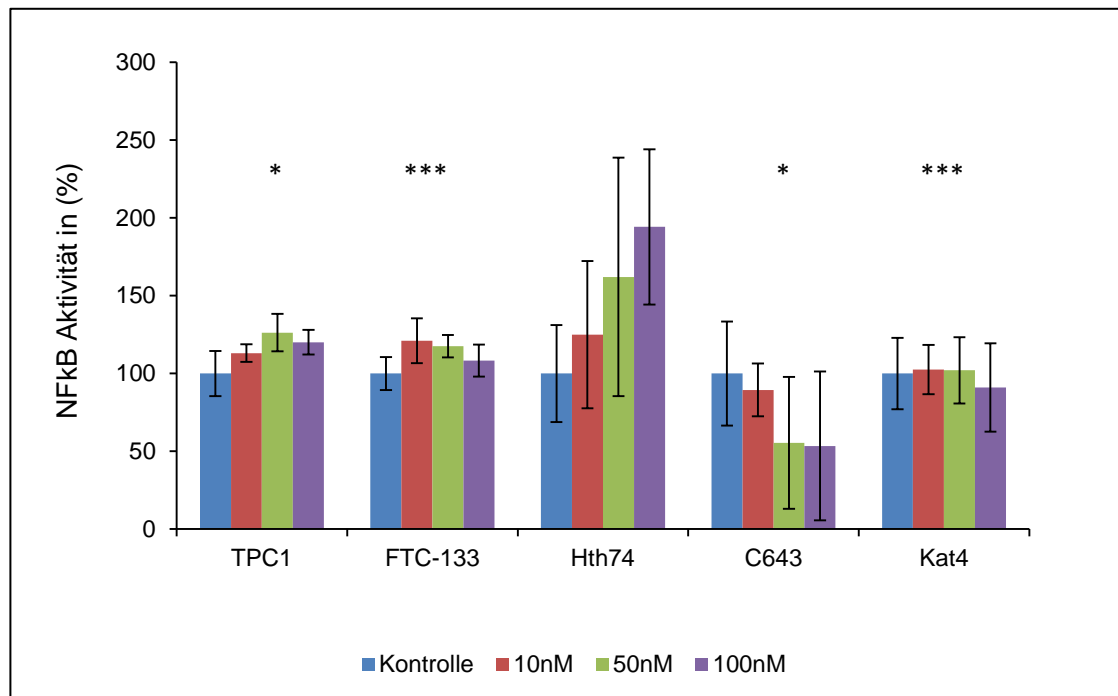


Abbildung 21: Veränderungen der NFκB-DNA-Bindungsaktivität in Prozent im Verhältnis zu den unbehandelten Kontrollen

DNA-Bindungsaktivität von NFκB der Zelllinien TPC1, FTC133, Hth74, C643 und Kat4 für 24 h mit 10 nM, 50 nM und 100 nM Bortezomib inkubiert und mittels ELISA basiertem trans-AM NFκB p65 Assay quantifiziert wie im Material und Methodenteil beschrieben. Die Ergebnisse repräsentieren prozentuale Veränderungen der mit Bortezomib behandelten Zellen bezogen auf die unbehandelten Kontrollen. Dargestellt sind die Mittelwerte zweier Experimente mit jeweils Doppelbestimmungen. Kontrolle: DMSO-behandelte Zellen. Für statistische Analysen wurde ein lineares Modell, angepasst für die Wiederholung des Experiments in verschiedenen Wells, benutzt, um den Effekt von Bortezomib auf die NFκB-Aktivität zu kontrollieren. *P<0,05, ***P<0,001

3.6 Ergebnisse zu Western Blot-Analysen

Von GRP78, einem Protein, das im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist, zur Klasse der Chaperone zählt und Zellen vor der Apoptose schützt, wurde angenommen, dass die Höhe der Expression eine Vorhersage über die Sensitivität der Zellen auf Proteasominhibitoren erlaubt (Wang et al., 2007). Diese Vermutung sollte mittels Western Blot-Analysen für die Zelllinien TPC1, FTC133, Hth74, C643 und Kat4 überprüft werden. Es erfolgte eine Untersuchung der basalen Expression der Proteine GRP78 und CHOP sowie unter Stimulation von Bortezomib mit Konzentrationen von bis zu 10 nM über 24 Stunden. Als Ladekontrolle diente β -Actin.

3.6.1 GRP78 (*Glucose-regulated Protein 78kDa*)-Expression

Um Hinweise auf die basale Expression von GRP78 zu erhalten, wurden Zelllysate der unbehandelten Schilddrüsenzelllinien mittels SDS-Page (20 μ g/Bahn) aufgetrennt und durch Immunoblotting analysiert. Es zeigte sich eine annähernd gleich starke basale Expression von GRP78 in den untersuchten Zelllinien. Lediglich die Hth74-Zellen wiesen eine deutlich geringere GRP78 Expression auf (s. Abbildung 22).

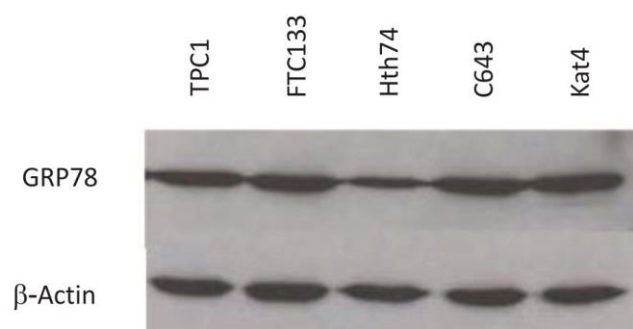


Abbildung 22: basale Expression von GRP78 mit Western-Blot Analyse

Zelllysate mit 20 μ g/Bahn getrennt auf der SDS-Page und analysiert mit Immunoblotting hinsichtlich der GRP78-Expression. Abgebildet ist die basale Expression von GRP78 der Zelllinien TPC1, FTC133, Hth74, C643 und Kat4 mit β -Actin als Ladekontrolle.

Nun wurden Zelllysate (20 µg/Bahn) der Zelllinien TPC1, FTC133, Hth74, C643 und Kat4 mit Anti-GRP78-Antikörpern hinsichtlich der GRP78-Expression unter Stimulation mit Bortezomib bis zu 10 nM und einer Inkubation von 24 Stunden untersucht. Die entwickelten Membranen sind in der Abbildung 23 dargestellt. Es sind, zumindest unter den gegebenen Versuchsbedingungen, keine eindeutigen Effekte auf die Expressionslevel von GRP78 in den eingesetzten Zelllinien sichtbar.

Im Gegenteil sind die Level von GRP78, selbst unter Vergrößerung der Ausschnitte, in allen verwendeten Zelllinien, unabhängig von der Behandlung mit Bortezomib und dessen eingesetzter Dosis konstant exprimiert.

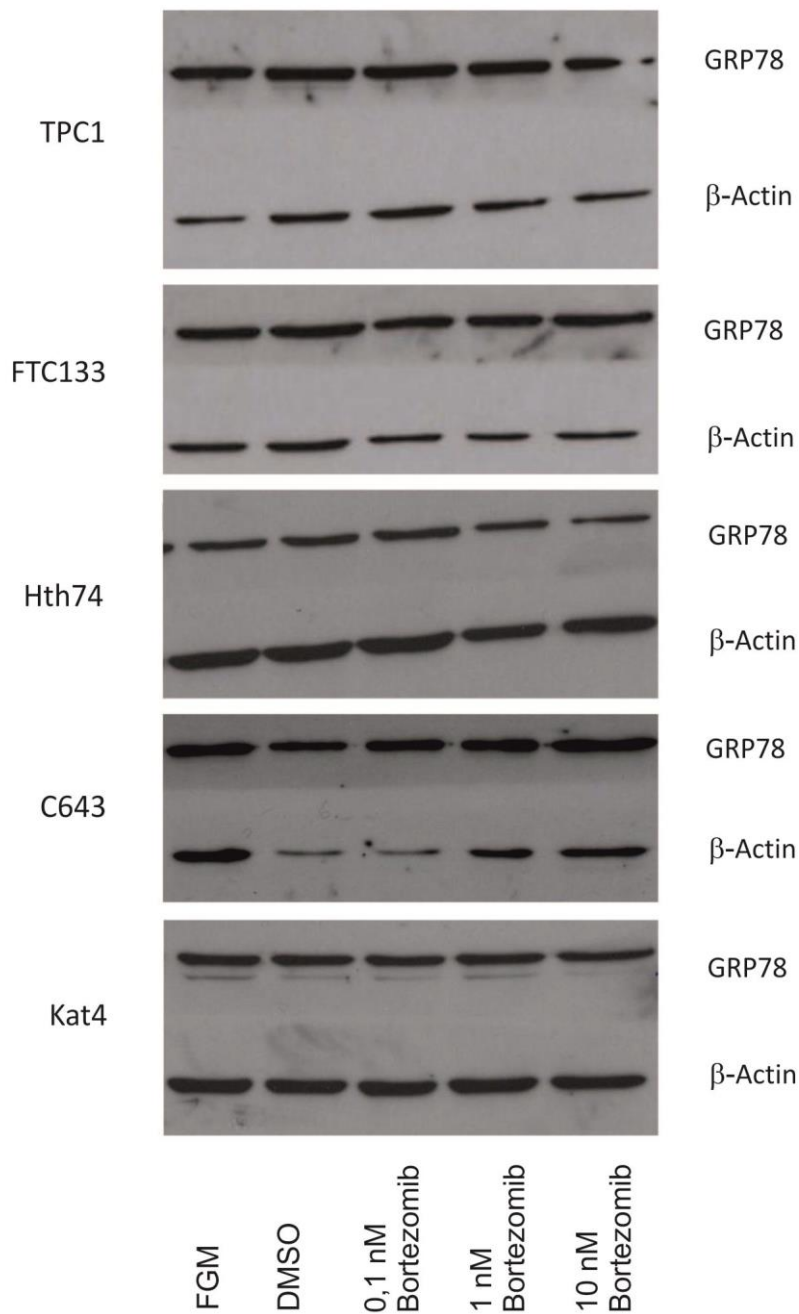


Abbildung 23: Bortezomibeffekte auf die GRP78 Expression

Zelllysate für 24 h mit bestimmten Konzentrationen von Bortezomib behandelt, wurden mittels Western-Blot-Analyse mit Hilfe von Anti-GRP78-Antikörpern hinsichtlich der GRP78-Expression analysiert (20 µg/Bahn).

Dargestellt ist die GRP78 Expression der Zelllinien TPC1, FTC133, Hth74, C643, Kat4 unter Bortezomib-stimulation. β-Actin diente als Ladekontrolle.

Legende: FGM=Leewert, DMSO=Kontrollwert, in aufsteigenden Konzentrationen Bortezomib (0,1 nM, 1 nM, 10 nM)

3.6.2 CHOP (CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein)

Ebenso wie GRP78 gehört auch das CHOP-Protein zu den Chaperonen, die im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert sind. Es wird angenommen, dass eine Überexpression von CHOP Apoptose induziert. Weiter wurde ein Zusammenhang zwischen der Überexpression dieses Proteins und der Sensitivität der Zellen gegenüber Protesaominhibitoren vermutet (Wang et al., 2007). Dies wurde mittels Western Blot-Analyse für die vorliegenden Zelllinien untersucht. 50 µg Zelllysate/Bahn wurden auf der SDS-Page getrennt und durch Immunoblotting hinsichtlich der basalen CHOP Expression analysiert. Es zeigte sich zelllinienabhängig eine unterschiedlich starke Expression. So zeigte Kat4 eine sehr starke CHOP-Expression, gefolgt von TPC1 und C643. Eine geringe Expression hingegen wiesen die Zelllinien FTC133 sowie Hth74 auf (s. Abbildung 24).

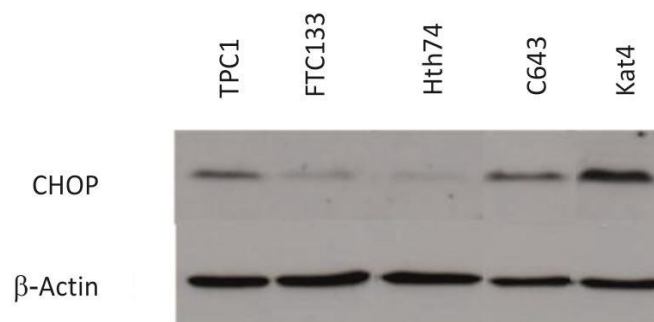


Abbildung 24: basale Expression von CHOP mit Western-Blot Analyse

Zelllysate mit 50 µg/Bahn getrennt auf der SDS-Page und analysiert mit Immunoblotting hinsichtlich der GRP78-Expression. Abgebildet ist die basale Expression von CHOP der Zelllinien TPC1, FTC133, Hth74, C643 und Kat4 mit β-Actin als Ladekontrolle.

Unter Stimulation mit Bortezomib bis zu 10 nM und einer Inkubation von 24 Stunden wurden Zelllysate (50 µg/Bahn) der Zelllinien TPC1, FTC133, Hth74, C643 und Kat4 mit Anti-CHOP-Antikörpern hinsichtlich der CHOP-Expression analysiert. Es zeigten sich zelllinienabhängig unterschiedliche Effekte durch die Bortezomibstimulation. Ein deutlicher Anstieg der CHOP-Expression ließ sich bei einer Konzentration von 10 nM bei den Zelllinien Hth74 und FTC133 ausmachen. Die Zelllinie TPC1 wies einen, mit der basalen Expression von CHOP verglichen, geringeren und zugleich kontinuierlicheren Anstieg der CHOP-Expression im Vergleich zu Hth74 und FTC133 auf. Bei der Kat4 konnte eine gleichbleibende Expression beobachtet werden. Die Zelllinie C643 schließlich zeigte unter steigender Konzentration des Proteasom-inhibitors sogar eine Abnahme der Expression von CHOP (s. Abbildung 25).

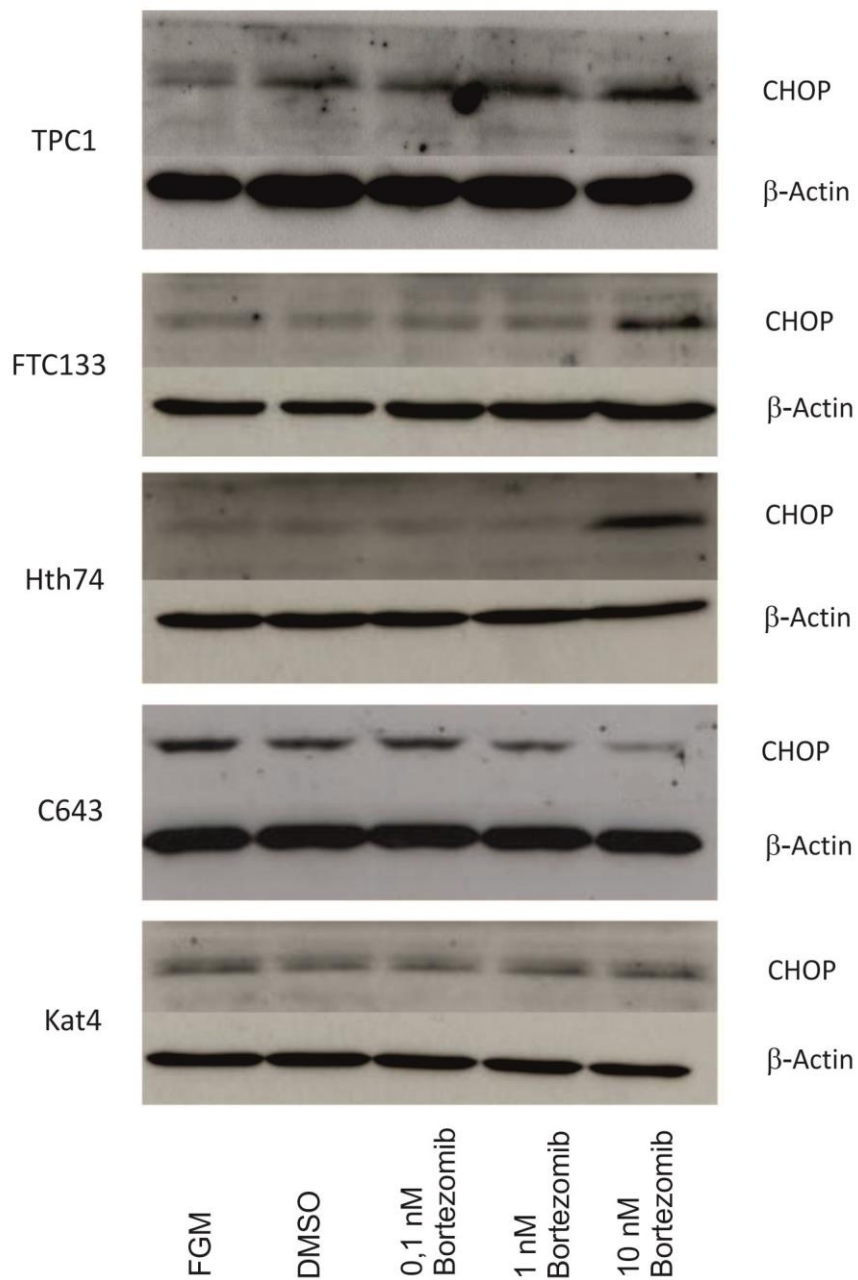


Abbildung 25: Bortezomibeffekte auf die CHOP Expression

Zelllysate, die für 24 h mit bestimmten Konzentrationen von Bortezomib behandelt wurden, wurden mittels Western Blot-Analyse mit Hilfe von Anti-CHOP-Antikörpern hinsichtlich der GRP78-Expression analysiert (50 µg/Bahn). Dargestellt ist die CHOP Expression der Zelllinien TPC1, FTC133, Hth74, C643, Kat4 unter Bortezomibstimulation. β-Actin diene als Ladekontrolle.

Legende: FGM=Leerwert, DMSO=Kontrollwert, in aufsteigenden Konzentrationen Bortezomib (0,1 nM, 1 nM, 10 nM)

4 Diskussion

Der Proteasominhibitor Bortezomib hat als antitumoraler Wirkstoff bereits entscheidende klinische Bedeutung in der Behandlung des Multiplen Myeloms und Mantelzell-lymphoms erlangt (Mateos et al., 2010). Aufgrund der guten Effektivität Bortezomibs gegenüber den genannten hämatologischen Malignomen, führte dies zu der Hoffnung, dass dieser Wirkstoff ebenso effektiv in der Behandlung von soliden Tumoren eingesetzt werden kann. Die ersten klinischen Studien, die eine gute Wirksamkeit bezüglich des fortgeschrittenen Prostata- sowie des nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms bewiesen, zeigten keine deutlichen antitumoralen Effekte in anderen soliden Tumoren (Wu et al., 2010). Deshalb sind weitere präklinische und klinische Studien notwendig, um das Potential für andere mögliche klinische Anwendungen zu erkennen. Da insgesamt betrachtet die bisherige Datenlage bezüglich solider Tumoren noch lückenhaft ist, was ebenso die Daten verschiedener Histiotypen des Schilddrüsenkarzinoms betrifft. Mit der vorliegenden Arbeit wurden die antitumoralen Effekte des Proteasominhibitors Bortezomib an verschiedenen Histiotypen des Schilddrüsenkarzinoms (papillär, follikulär und anaplastisch) erstmalig systematisch in vitro untersucht. Diese Studie erarbeitete erste Grundlagen für potentiell nachfolgende in vivo Versuche.

Hierbei waren insbesondere die Fragestellungen von Interesse, ob Bortezomib die Zellviabilität der einzelnen Zelllinien beeinflusst und sich die bereits beobachtete antiproliferative und proapoptotische Wirkung Bortezomibs an den hier untersuchten anaplastischen Schilddrüsenkarzinomzelllinien bestätigen lässt. Außerdem interessierte, ob es durch Bortezomib zu einer Aktivitätssteigerung von Caspase-3 kommt und welche weiteren apoptoseassoziierten Faktoren beeinflusst werden. Ebenso wurde mit der Durchflusszytometrie der Fragestellung nachgegangen, inwiefern Bortezomib auch bei Schilddrüsenkarzinomzelllinien zu einem G2/M-Arrest führt, was bereits unter anderem für Hepatozelluläre- und Brustkrebszelllinien gezeigt werden konnte (Baiz et al., 2009; Wang et al., 2010). In verschiedenen Studien wurde ein Wirken Bortezomibs auf die Zellviabilität nachgewiesen, das mit einer verminderten Aktivität des Transkriptionsfaktors NFκB einherging. Diese Tatsache wurde auch bereits für Schilddrüsenzelllinien beobachtet (Boccadoro et al., 2005; Mitsiades et al., 2006). Dieser Sachverhalt wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des *NFκB p65 Transcription Factor Assay Kit* für die

verwendeten Zelllinien untersucht. Neben dem Versuch, eine genauere Vorstellung der biologischen Effekte wie Proliferationshemmung, Apoptoseinduktion und Zellzyklusarrest zu bekommen und ob diese überhaupt bei den verwendeten Zelllinien unter Bortezomib zu erkennen sind, wurde außerdem die Vermutung aufgegriffen, dass sich die GRP78- und CHOP-Expression als mögliche prädiktive Faktoren erweisen können, um die Sensitivität von anaplastischen Schilddrüsenkarzinomzellen gegenüber Bortezomib vorherzusagen (Wang et al., 2007). Dieser Ansatz wurde mittels Western Blot-Analyse genauer untersucht.

Die vorliegende Arbeit beinhaltet eine systematische in vitro Analyse und Untersuchung zur Wirksamkeit Bortezomibs bei verschiedenen Histiotypen des Schilddrüsenkarzinoms. Damit wurde das Ziel verfolgt, ein besseres Verständnis möglicher molekularer Wirkmechanismen zu erlangen. In Zusammenschau der gesamten Untersuchungen soll zuletzt auch die Frage beantwortet werden, ob sich für Bortezomib Wirksamkeitsunterschiede hinsichtlich der verschiedenen Zelllinien aufzeigen lassen, vor allem zwischen den anaplastischen auf der einen und den differenzierten follikulären und papillären Zelllinien auf der anderen Seite. Von besonderem Interesse ist dabei, wie Bortezomib die anaplastischen Zelllinien beeinflusst. Gerade für das anaplastische Schilddrüsenkarzinom fehlen nach heutigem Kenntnisstand adäquate therapeutische Möglichkeiten (s. Abschnitt 1.2.4.2).

4.1 Zellproliferation

Es zeigte sich bei allen histologischen Typen der Schilddrüsenzelllinien (papillär, follikulär und anaplastisch) eine zeit- und dosisabhängige Zellzahlreduktion durch Bortezomib. Eine Reduktion der Zellzahl um 50 % wurde je nach Zelllinie zwischen 2 nM (C643, anaplastisch) und 12 nM (Kat4, anaplastisch) erzielt. Die follikuläre Zelllinie FTC133, die papilläre TPC1 und die anaplastische Hth74 lagen mit IC_{50} -Werten von 3 nM, 8 nM und 4 nM dazwischen (s. Abschnitt 3.1). Ähnliche Resultate zeigte auch die Studie von Mitsiades et al., 2006 für die anaplastischen Schilddrüsenzelllinien FRO, DRO90-1 und BHT101 und die medullären Schilddrüsenkarzinomzelllinien TT, RO81-1 und HRO85-1, in der die IC_{50} -Werte zwischen 8 nM-19 nM lagen. Die getestete follikuläre Zelllinie WRO und die papillären Zelllinien reagierten allerdings mit IC_{50} -

Werten von >100 nM weniger sensitiv auf Bortezomib. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete papilläre Zelllinie TPC1 und auch die follikuläre FTC133 reagierten mit IC_{50} -Werten von 3 nM und 8 nM auf eine Bortezomibbehandlung ebenso sensitiv, wie die untersuchten anaplastischen Schilddrüsenkarzinomzelllinien und sind damit sensibler als die von Mitsiades et al., 2006 getestete papilläre und follikuläre Schilddrüsenzelllinie. Dies demonstriert, dass selbst innerhalb eines Tumorstypus von Bortezomib induzierte Effekte unterschiedlich ausfallen. Ähnliche Beobachtungen konnten für Mammakarzinomzelllinien gemacht werden. Hier wiesen die IC_{50} -Werte zelllinienabhängig starke Divergenzen auf und lagen zwischen 5 nM und 1000 nM. Als mögliches molekulares Korrelat für das unterschiedliche antiproliferative Ansprechen und die differierenden IC_{50} -Werte wurde eine unterschiedliche Höhe der basalen Proteasomaktivität diskutiert. Dieser Aspekt scheint allerdings nicht ausschließlich die Divergenzen zu erklären, sodass von weiteren molekularen Mechanismen ausgegangen wird, die eine Rolle spielen (Codony-Servat et al., 2006). Als eine andere mögliche Erklärung wird die unterschiedlich schnelle Erholung einzelner Zelllinien nach Bortezomibbehandlung vermutet. Codony-Servat et al., 2006 beobachtete bei Mammakarzinomzelllinien, dass die relative Proteasominhibition durch Bortezomib bei einem Messzeitpunkt nach zwei Stunden bei der sensitiven Zelllinie SK-BR-3 als auch bei der resistenten Zelllinie BT-474 identisch waren. Nach 72 stündiger Inkubation unter Bortezomib zeigte sich allerdings eine stärkere Proteasominhibition der sensitiven SK-BR-3 Zelllinie, sodass eventuell eine schnellere Regeneration von der Proteasominhibition zur Resistenz der BT-474 Zelllinie, verglichen mit der SK-BR-3 Zelllinie, beiträgt (Codony-Servat et al., 2006). Es müssen weitere Untersuchungen folgen, um ein genaueres Verständnis zu bekommen, warum innerhalb einer Tumorentität größere Sensitivitätsunterschiede Bortezomib gegenüber vorkommen und auf welche molekularen Ursachen dies zurückzuführen ist.

Im Kontext mit anderen soliden Tumoren zeigten sich zum Teil ähnliche, zum Teil aber auch sehr viel höhere IC_{50} -Werte, die eine geringere Sensitivität gegenüber Bortezomib belegen. Für Prostatakarzinomzelllinien ergaben sich ähnliche IC_{50} -Werte von ≤ 10 nM (Williams et al., 2003b), für Zelllinien des malignen Pleuramesothelioms von 40 nM (Wang et al., 2010) und für Zelllinien des Nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms von 50 nM (Yang et al., 2004). Eine sehr viel geringere Sensitivität zeigten Mammakarzinomzelllinien bei denen sich Werte bis zu 1000 nM ergaben, um eine Reduktion der

Zellzahl um 50 % zu erreichen (Baiz et al., 2009; Wang et al., 2010). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Bortezomib die Zellviabilität aller in dieser Studie untersuchten Histiotypen des Schilddrüsenkarzinoms mit IC_{50} -Werten zwischen 2 nM -12 nM beeinflusst. Diese Werte stehen im Einklang mit den von Mitsiades et al., 2006 erhobenen IC_{50} -Werten für Schilddrüsenkarzinomzellen und weisen darüber hinaus eine stärkere Sensitivität in der papillären und follikulären Zelllinie auf. Verglichen mit den oben aufgezeigten IC_{50} -Werten anderer solider Tumoren, die bis zu 1000 nM betragen, was bereits weit jenseits jeglicher klinisch erreichbaren Plasmakonzentrationen liegt, reagierten die untersuchten Schilddrüsenzelllinien äußerst sensitiv und daher sehr vielversprechend auf die Behandlung mit Bortezomib. In diesem Kontext ist es außerdem wichtig zu erwähnen, dass die in der Klinik eingesetzten therapeutischen Dosierungen mit Werten bis zu 10 nmol/L Bortezomib limitiert sind (Codony-Servat et al., 2006). Zusammenfassend bedeutet dies, dass die klinisch einsetzbaren Konzentrationen bei allen in dieser Arbeit untersuchten Schilddrüsenkarzinomzelllinien eine deutliche Wirkung erzielt haben. Dies ist umso bedeutsamer, da viele andere solide Tumoren, wie bereits erwähnt, sehr viel höhere Konzentrationen für einen Wirkungseintritt benötigen als klinisch einsetzbar und vertretbar ist.

4.2 Caspase-3-Aktivität

Mit dem lumineszenzbasierten *CaspaseGLO^R 3/7 Assay* wurde eine dosis- und zelllinienabhängige Aktivitätssteigerung von Caspase-3 bis um den Faktor 20 beobachtet, wie es bei der papillären Zelllinie TPC1 der Fall war (s. Abbildung 14). Mit einer Aktivitätssteigerung um den Faktor 17 zeigte auch die anaplastische Zelllinie C643 eine starke Zunahme der Caspase-3-Aktivität, gefolgt von den anaplastischen Zelllinien Hth74 um den Faktor 16 und Kat4 mit dem Faktor 10 und zuletzt der follikulären Zelllinie FTC133 mit einer Aktivitätssteigerung um den Faktor 8. Dies belegt deutlich eine proapoptotische Wirkung von Bortezomib auf die untersuchten Schilddrüsenkarzinomzellen und zeigt ferner, dass die caspaseabhängige Kaskade bei den untersuchten Schilddrüsenzelllinien ein molekularer Wirkmechanismus ist, der für die Apoptoseinduktion aktiviert und genutzt wird. Diese Beobachtung stimmt mit Ergebnissen von Mitsiades et al., 2006 überein. In dieser Studie konnte eine caspaseabhängige Apoptose-

induktion durch Bortezomib für die anaplastische Zelllinie FRO sowie für die medulläre Zelllinie TT beobachtet werden (Mitsiades et al., 2006). Eine andere Untersuchung der anaplastischen Schilddrüsenkarzinomzelllinien 8305C, ARO und KAT4 bestätigt die Beobachtung einer Aktivitätssteigerung der Caspase-3 unter Bortezomibbehandlung ebenfalls (Conticello et al., 2007). Auch die Studie von Altmann et al., 2012 weist eine Aktivitätssteigerung der Caspase-3 für die anaplastische Schilddrüsenzelllinie C643 und SW1736 auf. Die Zelllinie C643 betrachtend erfolgt eine Aktivitätssteigerung um Faktor 15, was mit den in dieser Studie vorliegenden Ergebnissen übereinstimmt (Altmann et al., 2012). Diese Ergebnisse ebenso wie die der vorliegenden Arbeit belegen die Annahme, dass die Caspase-3-Aktivitätssteigerung und damit die Caspase-Kaskade eine bedeutende Rolle in der durch Bortezomib induzierten Apoptose der Schilddrüsenkarzinomzelllinien spielt. Dies wurde bisher vor allem für die anaplastischen Zelllinien aufgezeigt. In der vorliegenden Studie konnte dies auch für die papilläre Schilddrüsenzelllinie TPC1 und die follikuläre Schilddrüsenzelllinie FTC133 gezeigt werden. Bei Studien an anderen soliden Tumorentitäten konnte unter Bortezomib ebenso eine apoptoseassoziierte Aktivitätssteigerung der Caspase-3 beobachtet werden. So kam es zu einer Aktivitätssteigerung von Caspase-3 um den Faktor 3,2 bei Zelllinien des nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms (Ling et al., 2003). Auch in Brustkarzinomzelllinien sowie in Ovar- und Prostatazelllinien konnte eine Aktivitätssteigerung von Caspase-3 ausgemacht werden (Frankel et al., 2000; Wang et al., 2010; Williams et al., 2003b).

Wie bereits zuvor beobachtet (Wang et al., 2007), bestätigt sich auch in dieser Arbeit, dass bei den anaplastischen Schilddrüsenzelllinien die Caspaseaktivität unabhängig von einer Inhibierung der NF κ B-Aktivität geschieht. So zeigte beispielsweise die anaplastische Zelllinie Hth74 unter Bortezomib die größte prozentuale NF κ B-Aktivitätssteigerung, während gleichzeitig die Caspaseaktivität um den Faktor 16 stieg.

Diese Beobachtung wurde auch von Calvaruso et al., 2006 an HepG2 Zelllinien des hepatozellulären Karzinoms gemacht. Unter Bortezomib kam es zu einer Abnahme des I κ B α -Levels und konsekutiv sogar zu einer vermehrten Aktivität von NF κ B, unabhängig von der Caspase-3-Aktivität (Calvaruso et al., 2006). Auch bei Endometriumkarzinomzellen hatte Bortezomib eine proapoptotische Wirkung, allerdings

ebenso unter Aktivitätssteigerung von NF κ B (Dolcet et al., 2006), was auch für andere Proteasominhibitoren an Darmkrebszelllinien beobachtet wurde (Németh et al., 2004). Dies unterstreicht die Vermutung, dass die Caspaseaktivität unabhängig von der NF κ B-Aktivität ist und dass die durch Proteasominhibition induzierte Apoptose nicht immer mit einer Aktivitätsabnahme von NF κ B korreliert. Darüberhinaus wird durch diese Beobachtung die Frage aufgeworfen, inwiefern der NF κ B-Signalweg überhaupt in die Apoptoseinduktion durch Proteasominhibitoren involviert ist (Calvaruso et al., 2006; Dolcet et al., 2006; Németh et al., 2004; Wang et al., 2007) (s. Abschnitt 4.5)

4.3 Apoptose Protein Array

In Einklang mit der aufgezeigten Aktivitätssteigerung der Caspase-3 steht der durch den Apoptose Protein Array gezeigte Effekt der Induktion des Caspase-3 Proteins in allen fünf Zelllinien. Dies weist zusätzlich auf eine Apoptoseinduktion über diesen Signalweg hin. Weiter konnte mit dem Apoptose Protein Array festgestellt werden, dass neben Caspase-3 vor allem folgende proapoptotische Faktoren durch Bortezomib beeinflusst wurden: p53 Protein, TRAIL-Rezeptoren, HSP60, p21/Cip1, p27/Kip1 und folgende antiapoptotische Faktoren: HIF-1 alpha, Claspin und HO-1/HMOX/HSP32. Proteasominhibitoren führen zu einer Akkumulation des Tumorsuppressors p53 (Adams, 2004b; Boccadoro et al., 2005), welches ein Substrat des Proteasoms darstellt (Kubbutat et al., 1997) und eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellzyklus und der Apoptose, insbesondere bei anaplastischen Schilddrüsenkarzinomzelllinien, einnimmt (Kuerbit et al., 1992; Wu & Levine, 1994). Bei Zelllinien des Prostatakarzinoms beispielsweise, die mit Bortezomib behandelt wurden, konnte ein Anstieg des p53-Levels gezeigt werden (Williams & McConkey, 2003).

In der bisherigen Literatur wurde die durch Proteasominhibitoren induzierte Apoptose sowohl als p53 abhängig (Lopes et al., 1997) als auch als p53 unabhängig beschrieben (Shinohara et al., 1996). In der vorliegenden Arbeit wiesen drei von fünf Zelllinien, die papilläre TPC1 und die anaplastischen Zelllinien Hth74 und Kat4, eine Stabilisierung von p53 auf (s. Abschnitt 3.3). Es zeigte sich, dass die Zelllinien FTC133 (follikulär) und auch C643 (anaplastisch), die keine Stabilisierung des p53-Proteins aufwiesen, mit IC₅₀-Werten zwischen 2 nM und 4 nM sensitiver auf Bortezomib reagierten, als die

Zelllinien TPC1 (papillär) und Kat4 (anaplastisch), deren IC_{50} -Werten zwischen 8 nM und 12 nM lagen und die eine Stabilisierung des p53-Proteins zeigten. Hth74 (anaplastisch), wies ebenso einen Anstieg des p53-Proteins auf und reagierte ebenso sensitiv wie FTC133 und C643. Diese Beobachtung unterstützt die Vermutung von Ling et al., 2003, die sie anhand von Zelllinien des nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms stellten (Ling et al., 2003), dass einerseits die Zytotoxizität von Bortezomib mit der Aktivität des p53 Proteins korreliert und die Apoptose über einen p53-abhängigen Weg induziert werden kann, zugleich aber auch, dass die durch Bortezomib induzierte Apoptose nur zum Teil von p53 abhängig ist und es wahrscheinlich weitere Signalwege der Inhibierung des Zellwachstums gibt, die durch Bortezomib induziert werden.

In der Studie von Mitsiades et al., 2006 wird die Vermutung geäußert, dass die Stabilisierung des p53-Proteins durch Bortezomib in Zusammenhang mit dessen inhibierender Wirkung auf die NF κ B-Aktivität steht. In der vorliegenden Untersuchung ergibt sich dieser Zusammenhang nicht, sondern es zeigt sich ein von NF κ B unabhängiger Anstieg des p53-Proteins, wie beispielsweise die papilläre Zelllinie TPC1 als auch die anaplastische Zelllinie Hth74 verdeutlichen. Beide Zelllinien zeigten eine Stabilisierung des p53-Proteins, wiesen allerdings zugleich einen Anstieg der NF κ B DNA-Bindungsaktivität und keine Aktivitätsabnahme auf, was für eine Inhibierung spräche und somit auf eine NF κ B-abhängige p53 Stabilisierung schließen ließe. Aufgrund der Aktivitätszunahme von NF κ B und dem gleichzeitigen Anstieg von p53 in der Zelllinie TPC1 und HTh74 kann der von Mitsiades et al., 2006 vermutete Zusammenhang nicht bestätigt werden.

p53 dient als Transkriptionsfaktor für p21/CIP1 und der Literatur zufolge folgt einem Anstieg des p53 Levels durch Proteasominhibition ein Anstieg von p21/CIP1 (Maki et al., 1996). Die Akkumulation von p21/CIP1 und p27/KIP1, beides wichtige Regulatoren des Zellzyklus, ist von großem Interesse, da in verschiedenen Tumorentitäten (Wu et al., 2010), wie z.B. bei dem Prostata- und Blasenkarzinom (Lashinger et al., 2005), ihre Expression herunterreguliert wird. Ein Anstieg des p27/KIP1 Levels verhindert die Proliferation der Tumorzellen durch einen Zellzyklusarrest in G1 (Nickeleit et al., 2008). Stabilisierende Effekte durch Bortezomib auf p21/CIP1 und p27/KIP1 konnten für verschiedene Tumorentitäten, wie beispielsweise für das Pleuramesotheliom und das hepatozelluläre Karzinom (Baiz et al., 2009; Gordon et al., 2008; Zavrski et al., 2007)

und auch für drei von fünf in unserer Studie untersuchten Schilddrüsenkarzinomzelllinien gezeigt werden. Eine Akkumulation von p21/Cip1 und p27/KIP1 zeigte sich für die anaplastischen Zelllinien HTh74 und Kat4, was mit dem hohen G1-Anteil dieser Zellen korreliert (s. Tabelle 3). Eine verstärkte Aktivität von p21/CIP1 zeigte sich außerdem bei der papillären Zelllinie TPC1. Eine Stabilisierung von p21/CIP1 konnte auch Mitsades et al., 2006 für die medulläre Schilddrüsenkarzinomzelllinie TT und die anaplastische FRO nachweisen (Mitsiades et al., 2006). Die vorliegenden Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass durch Bortezomib eine Stabilisierung der zellzyklusregulierenden Proteine p21/CIP1 und p27/KIP1 stattfindet. Es zeigte sich außerdem, dass die Zelllinien TPC1, Hth74 und Kat4, die einen Anstieg des Proteins p53 aufwiesen, ebenso eine Akkumulation von p21 zeigten (s. Abschnitt 3.3), was mit der von Maki et al., 1996 getroffenen Aussage (Maki et al., 1996), dass p53 als Transkriptionsfaktor für p21/CIP1 dient und der Anstieg von p53 einen p21/CIP1 Anstieg zur Folge hat, übereinstimmt. Natürlich ist zu berücksichtigen, dass dieser Zusammenhang mit den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Methoden nicht nachzuweisen ist, sondern nur ein Anstieg beider Proteinlevel, von p53 und p21, zu verzeichnen war, was durch die Aussage von Maki et al., 1996 erklärt werden könnte.

Neuere Erkenntnisse lassen vermuten, dass möglicherweise vor allem p27/KIP1 für viele der durch Proteasominhibition erzeugten biologischen Effekte mitverantwortlich ist und beispielsweise über die Aktivierung der Caspasekaskade zu einer Apoptoseinduktion führt, vor allem bei hoher Aktivität des p53 Proteins. Zugleich kann p27/KIP1 aber auch einen Zellzyklusarrest und eine Hemmung der Zellproliferation bewirken. Interessanterweise konnte ebenso aufgezeigt werden, dass Bortezomib auch unabhängig von p27/KIP1 Apoptose induziert (Nickeleit et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit zeigte die anaplastische Zelllinie Hth74 den eindeutigsten Intensitätsanstieg p27/KIP1 betreffend. Unter Bortezomibbehandlung reagierte die Zelllinie Hth74 mit einem IC₅₀-Wert von 4,6 nM sehr sensitiv, zeigte mit einer Steigerung der Caspase-3-Aktivität um den Faktor 16 auch hier ein starkes Ansprechen und wies ebenso einen eindeutigen Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase auf. Alles Effekte, für die eine Induktion durch p27/KIP1 vermutet wird (Nickeleit et al., 2008). Unsere Beobachtungen bestätigen die Erkenntnisse von Nickeleit et al., 2008, sodass ein kausaler Zusammenhang zwischen der Expression von p27/KIP1 und den genannten Veränderungen bezüglich der Caspaseaktivität, der Proliferation und des Zellzyklus vermutet werden kann.

Zugleich verdeutlichen die Ergebnisse dieser Arbeit aber auch, dass Bortezomib unabhängig von p27/KIP1 Apoptose induzieren kann, was bereits von Nickeleit et al., 2008 beobachtet und in der vorliegenden Arbeit an den Zelllinien C643 und TPC1 festgestellt werden konnte. Beide wiesen keine Stabilisierung von p27/KIP1 auf, zeigten aber durch die Steigerung der Caspase-3-Aktivität, um den Faktor 20 (TPC1) und den Faktor 17 (C643), einen deutlichen proapoptotischen Effekt.

Die Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass Bortezomib p27/KIP1 stabilisiert, welches nach neueren Erkenntnissen eine entscheidende Bedeutung in den durch Proteasominhibitoren hervorgerufenen biologischen Effekten, wie Apoptose und Zellzyklusarrest einnimmt, und Bortezomib über diesen Signalweg wirkt, zugleich aber auch die Fähigkeit besitzt, unabhängig von p27/KIP1 Apoptose zu induzieren. Da als Ursache für die Stabilisierung von p27/KIP1 unter Bortezomib die Inhibition der proteasomalen Aktivität angenommen wird und manche Zelllinien keine Stabilisierung aufweisen, könnten andere Mechanismen greifen, die zur Apoptose führen. So gibt es Vermutungen, dass die Wirkungsweise Bortezomibs, auch die zytotoxische, nicht komplett durch die Proteasominhibition erklärt werden kann, sondern zusätzlich durch die Störung anderer zellulärer Systeme wie beispielsweise durch die Induktion von Endoplasmatischen Retikulum-Stress (ER-Stress) (Obeng et al., 2006).

Es wurden verschiedene Versuche unternommen Bortezomib mit anderen Chemotherapeutika zu kombinieren, um den antitumoralen Effekt zu potenzieren (Mujtaba & Dou, 2011; Johnson, 2014). So konnte unter Bortezomibstimulation die Sensitivität verschiedener Tumorzellen für eine TRAIL (*Tumor necrosisfactor-relatedapoptosis-inducingligand*)-induzierte Apoptose erhöht werden, wie beispielsweise anhand von Ovar- und Magenkarzinomzellen verdeutlicht werden konnte (Liu et al., 2010; Saulle et al., 2007). Einen Überblick über die Thematik gibt de Wilt et al., 2013. Die Kombinationsbehandlung mit Bortezomib und TRAIL scheint einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz hinsichtlich von Tumoren darzustellen, die bisher einer Apoptoseinduktion gegenüber resistent erschienen (Chen et al., 2009). Als eine mögliche Ursache für die erhöhte Sensitivität einzelner Karzinomzelllinien unter Bortezomib und TRAIL, wird unter anderem die vermehrte Expression von TRAIL-Rezeptoren diskutiert (Liu et al., 2010; Saulle et al., 2007; Seki et al., 2010). In der vorliegenden Studie wurden TRAIL-R1-Rezeptoren bei drei von fünf Zelllinien (TPC1, Hth74, Kat4) und TRAIL-R2-Rezeptoren bei vier von fünf Zelllinien (TPC1, Hth74,

C643, Kat4) unter Bortezomib induziert. Diese Beobachtungen stimmen mit der Studie von Conticello et al., 2007 überein, die für das anaplastische Schilddrüsenkarzinom nicht nur eine Hochregulation von TRAIL-Rezeptoren, sondern zugleich synergistische Effekte in der kombinierten Therapie von Bortezomib und TRAIL feststellten (Conticello et al., 2007). So potenzierten sich die zytotoxischen Effekte von Bortezomib gegenüber anaplastischen Schilddrüsenzelllinien unter kombinierter Behandlung mit TRAIL. Diese Beobachtungen sind vielversprechend und es sollten in vivo Untersuchungen folgen, die diese Ergebnisse prüfen.

Auf Seiten der antiapoptotischen Proteine kam es zu einer Induktion von Claspin und HIF-1 alpha bei allen fünf Zelllinien, auch XIAP wurde von vier der fünf Zelllinien induziert. Dass es unter der Behandlung von Bortezomib auch zu einer Stabilisierung antiapoptotischer Proteine kommen kann, wurde bereits beobachtet (Adams, 2004b). Werden die Veränderungen aller Proteine unter Bortezomibbehandlung, die durch den Apoptose Array in dieser Arbeit getestet wurden, berücksichtigt, so zeigt sich bei den anaplastischen Zelllinien C643, Hth74 und Kat4 sowie der papillären TPC1 ein Überwiegen der Induktion proapoptotischer Proteine, sodass insgesamt ein proapoptotischer Effekt unterstellt werden kann. Überraschenderweise reagierte die follikuläre Zelllinie FTC133 als einzige Zelllinie eher mit einer Herunterregulierung der proapoptotischen Proteine, lediglich das Caspase-3-Protein wurde hochreguliert. Allerdings konnte im Caspase-3-Assay, nur eine vergleichsweise geringe Steigerung der Enzymaktivität beobachtet werden. Warum die follikuläre Zelllinie als einzige kein so eindeutiges proapoptotisches Profil aufwies, kann mit den durchgeführten Analysen nicht abschließend geklärt werden. Tatsache ist allerdings, dass sie dennoch mit einem IC_{50} -Wert von 3 nM äußerst sensitiv reagierte und auch den stärksten G2/M-Arrest aller untersuchten Zelllinien aufwies. Es konnte außerdem festgestellt werden, dass die papilläre Zelllinie TPC1 und die anaplastischen Zelllinien Hth74 sowie Kat4 eine Induktion der meisten hier untersuchten proapoptotischen Proteine aufweisen, dennoch TPC1 und Kat4 mit IC_{50} -Werten von 8 nM und 12 nM vom zytotoxischen Profil her vergleichsweise wenig sensitiv auf Bortezomib reagieren. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Bortezomib neben der Proteasominhibition zusätzlich über andere Mechanismen wirkt. Diskutiert wird in diesem Zusammenhang vor allem eine Induktion des ER-Stress mit nachfolgender Cytochrom C Freisetzung (Nickeleit et al., 2008; Wu et al., 2010). Inwieweit dies auch für die hier untersuchten Zelllinien zutreffen könnte,

bleibt in weiteren Untersuchungen zu klären.

4.4 Zellzyklusarrest

Neben der Stabilisierung verschiedener pro- und antiapoptotischer Proteine induzierte Bortezomib einen dosisabhängigen G2/M-Arrest. Unter einer 24 stündigen Inkubation von Bortezomib mit 20 nM konnte eine Akkumulation der Zellen in der G2/M-Phase bis zu 50 % beobachtet werden (FTC133). Lediglich die Zelllinie TPC1 zeigte keinen G2/M-Arrest. Während der verschiedenen Phasen des Zellzyklus ist die proteasomale Aktivität streng reguliert und es erfolgt ein zeitlich genau abgestimmter Abbau verschiedener Cycline durch das Proteasom, um eine ungestörte Progression des Zellzyklus zu ermöglichen. Der im Rahmen der vorliegenden Arbeit bei vier von fünf Zelllinien durch Bortezomib beobachtete induzierte Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase lässt zusammen mit der gesteigerten Expression der cyclin-abhängigen Kinase Inhibitoren (CDKIs), p21CIP1 und p27KIP1 vermuten, dass Bortezomib das Zellwachstum zum Teil durch einen Arrest des Zellzyklus hemmt. Obwohl einige Cycline zusammen mit ihren cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) den Zellzyklus positiv regulieren, führt ein Verlust und/oder eine Inhibition der cyclin-abhängigen Kinasen zu einer Zellzyklusinhibition und folglich zu einer Reduktion des Zellwachstums (Wang et al., 2010). Warum es in der Zelllinie TPC1 zu keinem Zellarrest gekommen ist, bleibt unklar und sollte weiter untersucht werden. Dass TPC1 keine vermehrte Expression von p27/KIP1 aufwies, scheint nicht damit zu korrelieren, da auch die Zelllinie FTC133 keine verstärkte Induktion zeigte, aber einen eindeutigen Zellzyklusarrest aufwies. Auch für Prostata-, Hepatozelluläre-, Brustkarzinom- Mesotheliom- und Kolonkarzinomzelllinien wurde bereits ein durch Bortezomib hervorgerufener G2/M-Arrest gezeigt (Adams et al., 1999; Baiz et al., 2009; Kim, 2012; Wang et al., 2010), was die Vermutung unterstützt, dass Bortezomib durch einen G2/M-Arrest das Zellwachstum reduziert. Welche weiteren zellzyklusabhängigen Proteine Bortezomib in den hier untersuchten Schilddrüsenzelllinien aktiviert, muss in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden. So konnte an Kolonkarzinomzelllinien aufgezeigt werden, dass ein G2/M-Arrest durch Bortezomib mit einem Anstieg des intrazellulären ROS-Levels einhergeht sowie der Aktivierung des ATM-CHK1 (*ataxia telangiectasia mutated cell cycle*

checkpoint kinase1) Signalwegs (Kim, 2012). Es wurde von Schilddrüsenkarzinomzelllinien berichtet, die mit bis zu 25 nM Bortezomib behandelt wurden. Infolgedessen zeigte sich eine Akkumulation der Zellen in der Sub-G1 oder Sub-G0-Region, was auf eine Apoptoseinduktion hinweist (Mitsiades et al., 2006). Bei den hier durchgeführten Experimenten beeinträchtigten Konzentrationen über 20 nM Bortezomib die Zellviabilität beträchtlich, weshalb nur Konzentrationen ≤ 20 nM eingesetzt wurden.

4.5 NF κ B-Aktivität

Der Transkriptionsfaktor NF κ B spielt eine kritische Rolle in der Entstehung von Tumoren (Dolcet et al., 2005; Karin et al., 2002) und zeigt in vielen humanen Tumorentitäten eine konstitutive oder sogar erhöhte Aktivität (Pallares et al., 2004; Rayet & Gélinas, 1999). Dies konnte ebenfalls für medulläre und anaplastische Schilddrüsenkarzinomzelllinien gezeigt werden (Ludwig et al., 2001; Mitsiades et al., 2006; Pacifico et al., 2004) sowie auch für die getesteten Schilddrüsenzelllinien TPC1 (papillär), FTC133 (follikulär), Kat4, C643 und Hth74 (anaplastisch) in der vorliegenden Arbeit. Aufgrund der wichtigen Rolle, die NF κ B im Prozess tumoraler Entstehungen spielt (Dolcet et al., 2005), stellt dieses Protein ein wichtiges therapeutisches Ziel antitumoraler Bemühungen dar. Proteasominhibitoren werden auch deshalb zur Zeit als vielversprechende Chemotherapeutika genutzt, da diese Medikamentengruppe die Fähigkeit besitzt, NF κ B zu inhibieren (Hideshima et al., 2002; Ma et al., 2003; Tan & Waldmann, 2002), was auf die proteasomabh  ngige Regulation von I  B zurückzuführen ist (s. Abschnitt 1.3.3). Dies bestätigte sich auch für Schilddrüsenkarzinomzelllinien (Boccadoro et al., 2005; Mitsiades et al., 2006). Zugleich finden sich in der Literatur Studien, die eine erhöhte NF κ B-Aktivität unter Proteasominhibitoren an verschiedenen Tumorentitäten feststellten (Calvaruso et al., 2006; Dolcet et al., 2006; Németh et al., 2004; Wang et al., 2007), wie bereits in der Diskussion im Abschnitt Caspase-3 erwähnt. In der vorliegenden Arbeit wurde die NF κ B-Aktivität unterschiedlich durch Bortezomib beeinflusst. So zeigte sich unter Bortezomibbehandlung zelllinienabhängig sowohl eine erniedrigte (C643, anaplastisch), als auch erhöhte (TPC1, papillär, HTh74, anaplastisch) NF κ B-Bindungsaktivität oder gleichbleibende

NF κ B-Aktivität (FTC133, follikulär, Kat4, anaplastisch). Diese Effekte korrelierten allerdings nicht mit den durch Bortezomib hervorgerufenen Effekten auf die Zellviabilität. So zeigte beispielsweise die Zelllinie Hth74 mit durch Bortezomib gesteigerter NF κ B-Bindungsaktivität ein sehr sensibles Ansprechen (IC_{50} -Wert 4,6 nM) im Proliferationsassay. Ebenso reagierte aber auch die Zelllinie FTC133, für die sich keine Änderung der NF κ B-Aktivität nachweisen ließ, mit einem IC_{50} -Wert von 3,6 nM sehr sensibel auf Bortezomib.

Anhand von Ergebnissen an anaplastischen und medullären Schilddrüsenzelllinien vermutete Mitsiades et al., 2006 neben der Inhibierung von NF κ B durch Bortezomib auch eine Korrelation zwischen dem basalen Aktivitätslevel von NF κ B einer Zelllinie und der Sensitivität gegenüber Bortezomib. Konkreter bedeutet dies, dass Zellen die einen hohen basalen Aktivitätslevel von NF κ B aufweisen, sensibler auf Bortezomib reagieren als Zellen die einen niedrigeren Aktivitätslevel besitzen. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich für alle genutzten Zelllinien eine basale NF κ B-Aktivität (s. Abschnitt 3.5), wie sie in normalen, nicht karzinogenen Schilddrüsenzelllinien nicht nachgewiesen werden konnte (Mitsiades et al., 2006). Ein Zusammenhang zwischen einer hohen basalen NF κ B-Aktivität und zugleich einem guten Ansprechen auf Bortezomib zeigt sich allerdings in der vorliegenden Arbeit nicht. So wiesen beispielsweise die Zelllinien Kat4 und TPC1 die höchsten basalen Bindungskapazitäten von NF κ B auf (s. Abschnitt 3.5), reagierten aber von allen untersuchten Zelllinien am unsensibelsten auf Bortezomib. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der vorliegenden Arbeit eine basale Aktivität von NF κ B für alle fünf untersuchten Zelllinien festgestellt werden konnte, was die bisherigen Ergebnisse in der Literatur bestätigt. Allerdings kam es zu unterschiedlichen Reaktionen unter Bortezomib bezüglich der NF κ B-Aktivität und es konnte kein Zusammenhang zwischen der NF κ B-Aktivität und der Zellviabilität hergestellt werden. Ebenso konnte auch kein Zusammenhang zwischen der basalen NF κ B Expression und der Sensibilität der Zelllinien gegenüber Bortezomib beobachtet werden.

Auch wenn bisher oft die verhinderte Degradierung von I κ B durch Proteasominhibitoren und die darauffolgende Inhibierung von NF κ B als ein wichtiger Wirkmechanismus der Proteasominhibitoren angesehen wurde, stimmen die unterschiedlichen Reaktionen der in dieser Arbeit verwendeten Schilddrüsenzelllinien gegenüber Bortezo-

mib bezüglich der NF κ B-Bindungsaktivität mit bereits zuvor erhobenen Ergebnissen überein. So zeigten Schilddrüsenkarzinomzelllinien, die mit dem Proteasominhibitor MG132 behandelt wurden keine Veränderung der NF κ B-DNA-Bindungsaktivität, was bereits zu der Vermutung führte, dass proteasomabhängige Apoptose von Schilddrüsenkarzinomzellen nicht immer mit einer Reduktion der NF κ B-Aktivität einhergeht (Wang et al., 2007). Auch Zelllinien des Kolonadenokarzinoms zeigten unter MG132 eine steigende NF κ B-Aktivität (Németh et al., 2004). Unter Bortezomib wurden bereits ähnliche Beobachtungen gemacht. So wiesen beispielsweise Zelllinien des Endometriumkarzinoms und Multiplen Myeloms unter Bortezomib eine deutlich erhöhte NF κ B-Aktivität auf. Dieses Resultat ergab sich auch für drei weitere an diesen Zelllinien getesteten Proteasominhibitoren. (Dolcet et al., 2006; Hideshima et al., 2009; Markovina et al., 2008). Die gefundenen Daten in der aktuellen Literatur sowie die Beobachtungen dieser Arbeit unterstützen die Annahme, dass Schilddrüsenkarzinomzelllinien auf Bortezomib möglicherweise mit proteasomabhängigen Signalwegen reagieren, die unabhängig vom NF κ B-Mechanismus sind, was im Einklang mit Beobachtungen für das Multiple Myelom und auch das Magenkarzinom (Liu et al., 2010; Mitsiades et al., 2002a) stünde. Die Literatur führt mögliche andere molekulare Mechanismen unabhängig von NF κ B auf, die in den durch Proteasominhibitoren hervorgerufenen Zelltod involviert sind. Dies sind beispielsweise der ER-Stress (Fribley et al., 2004; Nawrocki, et al., 2005a; Nawrocki et al., 2005b), eine steigende Expression von Todesrezeptoren (Yoshida et al., 2005) oder neueren Erkenntnissen zufolge eine Hochregulation der zur BH3-Familie zählenden Proteine, wie NOXA (Fernández et al., 2005; Pérez-Galán et al., 2006; Qin et al., 2005), Bik oder Puma (Zhu et al., 2005a; Zhu et al., 2005b). In der gesteigerten Aktivität von NF κ B wurde unter anderem auch eine Erklärung für die zum Teil unter Bortezomibbehandlung unerwünscht auftretenden Effekte vermutet (Dolcet et al., 2006).

4.6 Western Blot Analyse

GRP78 und CHOP sind Proteine, die zur Klasse der Chaperone zählen, die in Folge von ER-Stress-Reaktionen aktiviert werden. Dabei schützt GRP78 die Zellen vor Apoptose,

wohingegen CHOP als Protein in die Induktion der ER-Stress induzierten Apoptose involviert ist. Für beide Proteine, GRP78 und CHOP, wurde vermutet, dass deren Expression die Sensitivität von anaplastischen Schilddrüsenzelllinien gegenüber verschiedenen Proteasominhibitoren vorhersagen kann (Wang et al., 2007). So wird darauf hingewiesen, dass die Sensitivität von anaplastischen Schilddrüsenzelllinien gegenüber der Proteasominhibition zum einen durch den basalen GRP78-Level reguliert wird, zum anderen aber die Proteine GRP78 oder CHOP unter Behandlung mit Bortezomib vermehrt exprimiert werden. Eine Überexpression von GRP78 unterdrückt die durch den Proteasominhibitor induzierte Apoptose, während eine Suppression des CHOP Proteins eine durch Proteasominhibitor induzierte Apoptose zum Teil verhindert. Dieser Umstand weist darauf hin, dass der durch Proteasominhibitor erreichte Zelltod zum Teil durch die Hochregulierung des CHOP-Proteins herbeigeführt wird.

In der vorliegenden Studie zeigte sich der basale GRP78 Level bei allen fünf Zelllinien nahezu auf dem gleichen Niveau und es ergab sich auch nach der Behandlung mit Bortezomib keine Veränderung der Expression. In Bezug auf die Studie von Wang et al., 2007 stimmen diese Ergebnisse mit der hohen Sensitivität von IC_{50} -Werten mit ≤ 12 nM und der aufgezeigten Apoptoseinduktion überein. Die basale Expression des CHOP Proteins hingegen variierte abhängig von der Zelllinie und wurde unter der Behandlung mit Bortezomib verschieden beeinflusst. Die Zelllinie FTC133 und Hth74 zeigten unter steigenden Konzentrationen Bortezomibs eine Hochregulation von CHOP, während TPC1 und Kat4 kaum Veränderungen der Expression von CHOP aufwiesen und C643 eine Herunterregulierung des Proteins zeigte. Im Gegensatz zu der Studie von Wang et al., 2007 ergab sich in der vorliegenden Arbeit kein Zusammenhang zwischen der Sensitivität einer Zelllinie gegenüber Bortezomib und der Expression von CHOP. So wies die Zelllinie C643, die am Sensitivsten auf Bortezomib reagierte, anstatt einer Hochregulation eine Herunterregulierung von CHOP auf, was der Vermutung von Wang et al., 2007 widerspricht. Da diese Autoren in erster Linie eine zeitabhängige Veränderung der CHOP Expression beschreiben, in der vorliegenden Arbeit die CHOP Expression aber konzentrationsabhängig untersucht wurde, bedarf es weiterführender Untersuchungen um diesen Aspekt genauer zu beleuchten.

Zusammenfassend und im Hinblick auf die eingangs formulierten Fragestellungen kann festgehalten werden, dass Bortezomib die Zellviabilität der getesteten Schilddrüsen-

karzinomzelllinien beeinflusste. Unter Bortezomib kam es zu einer zeit- und dosisabhängigen Proliferationshemmung mit IC_{50} -Werten zwischen 2 nM und 12 nM, was bedeutet, dass die Schilddrüsenkarzinomzelllinien im Vergleich zu anderen soliden Tumoren sehr sensitiv reagierten. Dies ist vor allem vor dem Hintergrund der klinisch einsetzbaren Dosierung von Bortezomib, die mit 10 nmol/L angegeben ist, von entscheidender Bedeutung.

Unter Bortezomib kam es weiter zu einer zelllinien- und dosisabhängigen Aktivitätssteigerung des Caspase-3 Proteins bis um den Faktor 20. Dies ist ein Indiz zum einen für die Induktion der Apoptose über die caspaseabhängige Kaskade unter Bortezomib und zum anderen für die bedeutende Rolle dieses Proteins in der Apoptoseinduktion unter Bortezomib. Zugleich konnte gezeigt werden, dass die Caspaseaktivität unabhängig von der Inhibierung der NF κ B-Aktivität beeinflusst wird und so die Vermutung verstärkt, dass die durch Proteasominhibition induzierte Apoptose nicht immer mit einer Aktivitätsabnahme von NF κ B korreliert.

Weiter ließ sich bei den anaplastischen Zelllinien C643, Hth74 und Kat4 sowie bei der papillären Zelllinie TPC1 ein proapoptotischer Effekt unter Bortezomibbehandlung erkennen. Neben der Hochregulation des Caspase-3 Proteins wurden beispielsweise auch p53, TRAIL-Rezeptoren und p21/Kip1 durch Bortezomib beeinflusst. Lediglich die follikuläre Zelllinie FTC133 zeigte eine schwächere Induktion der proapoptotischen Proteine und eine vergleichsweise geringe Steigerung der Caspase-3-Aktivität. Eine ausreichende Erklärung für das Verhalten der Zelllinie FTC133 ergibt sich aus den vorliegenden Ergebnissen nicht.

Unter Bortezomib ließen alle anaplastischen Zelllinien sowie die follikuläre Zelllinie einen Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase erkennen.

Die Auswirkungen von Bortezomib auf die nukleare Transkription der NF κ B-Aktivität blieben widersprüchlich.

Bezüglich des Proteins GRP78 stimmen die vorliegenden Ergebnisse mit der Vermutung von Wang et al., 2007 überein, dass ein Zusammenhang zwischen dem Level der Expression von GRP78 und der Sensitivität gegenüber Schilddrüsenkarzinomzelllinien bestehen kann. Hinsichtlich des CHOP Proteins ist in der vorliegenden Arbeit kein Zusammenhang zwischen der Sensitivität einer Zelllinie gegenüber Bortezomib und der Expression von CHOP zu erkennen.

In Zusammenschau der Ergebnisse und die Fragestellung betrachtend, ob Wirksamkeitsunterschiede von Bortezomib auf die verschiedenen Zelllinien, speziell aber hinsichtlich der verschiedenen Histiotypen -anaplastisch (C643, Kat4, Hth74)- oder differenziert (FTC, TPC) auszumachen sind, ließen sich keine typischen Wirkmechanismen aufzeigen, die spezifisch für die anaplastischen Schilddrüsenzelllinien wären. Vielmehr zeigte sich, dass die Effektivität an die individuelle Tumorbilogie geknüpft ist und eine große Variabilität aufweist, sodass selbst innerhalb eines Histiotyps, wie den anaplastischen Schilddrüsenzelllinien, Unterschiede im Wirkungsprofil Bortezomib gegenüber bestehen. Dies ist allerdings nicht allzu verwunderlich, da bekannt ist, dass die Gruppe der anaplastischen Schilddrüsenkarzinome sehr heterogen ist und jede Zelllinie für sich betrachtet werden sollte (Stenner et al., 2008). Aufgrund dieses Erkenntnis ist es für eine klinisch erfolgreiche Anwendung notwendig, dieser nach Möglichkeit eine präklinische Evaluation hinsichtlich den an der antitumoralen Wirkung beteiligten Faktoren und Signalwegen Bortezomibs vorausgehen zu lassen. Besser noch wäre die Möglichkeit individueller präklinischer Testung, beispielsweise in Zellkulturen aus während der Operation entnommenem Tumorgewebe. Aufgrund der hier aufgezeigten Datenlage ist eine klinische Evaluation von Bortezomib gegenüber dem anaplastischen Schilddrüsenkarzinom gerechtfertigt.

4.7 Ausblick

Mit der zielgerichteten Behandlung verschiedener protumorigener Prozesse durch neue Medikamente ist neben die konventionelle Chemotherapie eine weitere Therapieoption in der Behandlung von malignen Erkrankungen getreten. Die Entwicklung von monoklonalen Antikörpern und *small molecules* füllen den Begriff mit Inhalt. Die neueren Substanzen ermöglichen im Vergleich zur konventionellen Therapie einen zielgerichteten Einsatz gegen spezielle Rezeptoren oder Moleküle bzw. Molekülkomplexe, wie z.B. dem Proteasom. Mit der Anerkennung des Proteasominhibitors Bortezomib als Erstlinientherapie für das multiple Myelom und das Mantelzelllymphom als Einzel- oder Kombinationstherapie mit anderen Chemotherapeutika durch die *FDA*, konnten bereits erste klinische Erfolge verbucht werden (Mateos et al., 2010). Weitere präklinische Untersuchungen, sowohl in vitro als auch in xenotransplantierten Modellen,

verdeutlichten die antitumorale Effektivität von Bortezomib gegenüber einer großen Anzahl von Tumorzelllinien. Dazu zählen beispielsweise die Zelllinien des Prostata-, Pankreas, Plattenepithel- und Nierenzellkarzinoms, wodurch neben malignen hämatologischen Erkrankungen auch solide Tumoren in den Fokus des Interesses rücken (Adams, 2002; Jagannath et al., 2005; Kondagunta et al., 2004; Richardson et al., 2005; Shah et al., 2001; Sunwoo et al., 2001). Anhand der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass Bortezomib in vitro eine gute antitumorale Effektivität gegenüber papillären, follikulären und auch anaplastischen Schilddrüsenkarzinomzelllinien besitzt. Besonderes Interesse galt den wenig differenzierten Schilddrüsenzelllinien, da dem anaplastischen Schilddrüsenkarzinom bisher therapeutisch noch wenig entgegengesetzt werden kann. Trotz multimodaler Therapieansätze mit chirurgischer Intervention, Chemo- und Strahlentherapie sind die Resultate unbefriedigend. Durch die vorliegende Arbeit fand erstmals eine systematische in vitro Analyse von Bortezomib als Monotherapeutikum im Einsatz gegen die anaplastischen Schilddrüsenzelllinien C643, Hth74 und Kat4 statt und lieferte vielversprechende Ergebnisse. Die in vitro Versuche legen die Grundlage für weiterführende Experimente und animieren dazu, Bortezomib auch in vivo an Xenotransplantaten wenig differenzierter Schilddrüsenkarzinomzellen im Mausmodell zu testen, was bereits in der eigenen Arbeitsgruppe nachfolgend geschehen ist. Nach unserem Wissensstand konnte dadurch zum ersten Mal eine relevante Reduktion des Tumorstwachstums von anaplastischen Schilddrüsenzellen in vivo an einem xenotransplantierten Modell gezeigt werden (Wunderlich et al., 2011). Diese in vivo Beobachtungen bestätigen die vielversprechenden in vitro Ergebnisse und jede Studie für sich allein, als auch besonders in Zusammenschau, führen zu dem Schluss, dass eine klinische Evaluation der Bortezomibbehandlung für das anaplastische Schilddrüsenkarzinom gerechtfertigt ist (Altmann et al., 2012).

Die geringe Inzidenz des anaplastischen Schilddrüsenkarzinoms, das aggressive Wachstumsverhalten und die sehr geringe Überlebensdauer bei Diagnosestellung erschweren die Bedingungen für klinische Studien, in denen neuere Substanzen wie Bortezomib getestet werden können, sodass bis heute hierzu kaum klinische Daten vorhanden sind. Bei einem 57-jährigen Mann mit Schilddrüsenkarzinom konnte aus dem operativ entfernten Tumorgewebe die anaplastische Schilddrüsenzelllinie MB1 etabliert werden. Präklinische in vitro Versuche an dieser Zelllinie zeigten antitumorale Aktivität und Effektivität des Proteasominhibitors Bortezomib (Stenner et al., 2008). Als *second-line*

Therapie konnten drei Zyklen Bortezomib als Monotherapie appliziert werden, die effektiv waren und gut toleriert wurden, letztendlich aber nicht das Potential hatten das metastasierte anaplastische Schilddrüsenkarzinom zu kontrollieren.

Im Hinblick auf die Entstehung von anaplastischen Schilddrüsenkarzinomen geschieht dies nach dem heutigen Wissensstand durch die Kumulation verschiedener einzelner Gendefekte, so dass es wahrscheinlich ist, dass die Behandlung spezifischer einzelner molekularer Ziele oft nicht ausreichen wird, um eine Tumorprogression zu kontrollieren. Deshalb sollte in Zukunft der Fokus weiterer Studien auf dem Einsatz von Bortezomib in Kombination mit anderen Chemotherapeutika liegen, in der Hoffnung synergistische Effekte zu erzielen und die Effektivität von Bortezomib im Einsatz gegen das anaplastische Schilddrüsenkarzinom zu steigern. Dieser Ansatz wurde vereinzelt in vitro verfolgt beispielsweise mit dem kombinierten Einsatz von TRAIL und Bortezomib (Poulaki et al., 2002; Yoshida et al., 2011) sowie auch in unserer eigenen Arbeitsgruppe durch kombinierte Behandlung mit Bortezomib und dem Aurorakinaseinhibitor MLN8054 (Wunderlich et al., 2012). Auch in anderen soliden Tumorentitäten wird dieser Ansatz verfolgt. Einen guten Überblick über den aktuellen Stand der Forschung gibt Johnson, 2014.

Es bleibt allerdings zu bedenken, dass durch die Heterogenität des anaplastischen Schilddrüsenkarzinoms jede Zelllinie individuell auf verschiedene Chemotherapeutika reagiert, wie es auch in der vorliegenden Arbeit aufgezeigt werden konnte, sodass es schwierig sein wird, ein spezielles Therapieregime für das anaplastische Schilddrüsenkarzinom zu entwerfen, sondern vielmehr jedes Tumorgewebe individuell auf die defekten Mechanismen und die therapeutischen Möglichkeiten getestet werden sollte. Mit der *targeted therapy* und dem Einsatz von *small molecules* wie Bortezomib ist das therapeutische Feld bereichert worden. Dies veranlasst zu der Hoffnung, dass dem anaplastischen Schilddrüsenkarzinom in Zukunft unter anderem durch die Kombinationsbehandlung mit Bortezomib eine vielversprechendere therapeutische Antwort gegeben werden kann, als es momentan noch der Fall ist.

5 Zusammenfassung

Das Schilddrüsenkarzinom ist die häufigste maligne Erkrankung der endokrinen Organsysteme. Während für gut differenzierte Schilddrüsenkarzinome wie das papilläre und follikuläre Karzinom sehr gute Therapieoptionen existieren, die ein 10-Jahres-überleben von bis zu 98 % ermöglichen, versagen diese bei anaplastischen Karzinomen. Das anaplastische Karzinom entspricht dem komplett entdifferenzierten Histiotyp und zählt zu den aggressivsten humanen Karzinomen mit einer Überlebenszeit von wenigen Monaten nach Diagnosestellung. Das Versagen konventioneller Behandlungsansätze erfordert neue innovative Therapiemöglichkeiten. Ein neuer Ansatz der antitumoralen Therapie ist der zielgerichtete Angriff des Ubiquitin-Proteasom Signalwegs durch Proteasominhibitoren.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirksamkeit von Bortezomib (PS-341, Velcade®), der erste Proteasominhibitor, der eine klinische Zulassung erreichte, anhand verschiedener Histiotypen des Schilddrüsenkarzinoms *in vitro* evaluiert.

An drei anaplastischen (Hth74, C643, Kat4), einer follikulären (FTC133) und einer papillären (TPC1) Schilddrüsenzelllinie wurden die durch Bortezomibbehandlung induzierten antiproliferativen, proapoptotischen und transkriptionalen Effekte *in vitro* untersucht.

Bortezomib inhibierte die Zellproliferation mit IC_{50} -Werten zwischen 4 nM und 12 nM, steigerte die Aktivität der Caspase-3 und induzierte einen Zellzyklusarrest. Die NF κ B-Aktivität wurde hingegen verschieden beeinflusst.

Durch die vorliegende systematische *in vitro* Analyse von Bortezomib an den aufgeführten Histiotypen des Schilddrüsenkarzinoms, konnte aufgezeigt werden, dass Bortezomib effektiv in der Behandlung von anaplastischen Schilddrüsenkarzinomzellen ist. Dies konnte durch eine signifikante Reduktion des Zellwachstums sowie der Apoptoseinduktion verdeutlicht werden. Die Beeinflussung nuklearer Transkription hingegen bleibt kontrovers.

Bortezomib wird bereits als Erstlinientherapie des Multiplen Myeloms eingesetzt und wurde in verschiedenen präklinischen und klinischen Studien an anderen soliden Tumorentitäten getestet. Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen *in vitro* Effekte

von Bortezomib, insbesondere an drei anaplastischen Zelllinien, rechtfertigen eine klinische Evaluation der Bortezomibbehandlung beim anaplastischen Schilddrüsenkarzinom und zeigen, dass diese neue Therapieoption durchaus auch für das anaplastische Schilddrüsenkarzinom vielversprechend sein könnte.

6 Abstract

Evaluation of the effectiveness of proteasome inhibition on thyroid cancer cell lines in vitro

Among the endocrine malignancies thyroid cancer (TC) is the most common malignant tumor and shows an increasing incidence. For differentiated thyroid cancer like follicular and papillary carcinoma there are standardized treatments by surgery and radioiodine which result in long term survival. The 10-year survival rate is given as 98%. In contrast this therapeutic regime fails at anaplastic thyroid carcinoma (ATC), which is a dedifferentiated thyroid cancer and belongs to the most aggressive malignancies with fatal outcome of only a few months after diagnosis. In face of the poor clinical outcome of ATC-patients, there is a great effort to develop new effective and innovative treatment options like new antitumoral compounds targeting various tumor promoting pathways. One new approach of this targeted therapy is to inhibit the ubiquitin-proteasome pathway representing a major pathway for degradation of intracellular proteins.

In this study the effectiveness of Bortezomib (PS-341, Velcade®) was examined on different TC cell lines.

Three anaplastic (C643, Hth74 and Kat4), one follicular (FTC133) and one papillary (TPC1) TC cell lines were used. At these TC cell lines antiproliferative, proapoptotic and transcriptional effects of Bortezomib were analyzed in vitro.

Bortezomib inhibited proliferation of TC cells with IC_{50} values at 144 hour between 4 nM and 12 nM, increased caspase-3 activity and induced cell cycle arrest. The NF κ B activity was affected differently.

The present systematic in vitro study reveals the effectiveness of Bortezomib on ATC cell lines with a significant reduction of cell viability and a proapoptotic activity of

Bortezomib on TC cell lines. Nevertheless the influence on nuclear transcription remains controversial.

Bortezomib is already used as first-line therapy in multiple myeloma and furthermore entered preclinical and clinical studies in solid tumors. Based on the data of the present study, particularly with regard to ATC cell lines, a clinical evaluation of Bortezomib treatment in ATC is warranted and raised new hope of detecting an effective treatment option for ATC, either alone or in combination with other chemotherapeutic agents.

7 Anhang

7.1 Materialliste

7.1.1 Zellkultur

...die folgenden Substrate fanden Verwendung...

DMEM/HAM'S F-12 (1:1), w/o L-Glutamine	Biochrom AG, Deutschland
DMEM/HAM'S F-12 (1:1), w stable Glutamine	Biochrom AG, Deutschland
Fetales Rinderserum, FCS	PAA Laboratories, Österreich
Glycyl-L-histidyl-L-lysin-Acetat	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
Haemacytometer Deckgläser 20x26mm	Plan Optik, Deutschland
Hydrocortison	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Plan Optik, Deutschland
PBS-Dulbecco w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom AG, Deutschland
Penicillin/Streptomycin 10000U / 10000µg/ml	Biochrom AG, Deutschland
Rinderinsulin	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
Somatostatin	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
Transferrin	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
Trypanblau 0,1%	Apotheke der Philipps-Universität
Trypsin/EDTA, 0,05%/0,02% (w/v) in PBS	Biochrom AG, Deutschland
w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺	
Zellkulturflaschen, Cellstar 175cm ² und 75cm ²	Greiner BioOne GmbH Deutschland
175 cm → 650 ml, 75 cm → 250 ml	

Ansatz 1 Liter H5-Medium (10xStock): 50 ml Aliquots bei -20°C aufbewahren

1000 ml DMEM/HAM'S F-12 (1:1), w stable Glutamine

10µl Glycyl-L-histidyl-L-lysin-Acetat

10µl Hydrocortison

50mg Transferrin

100µg Somatostatin

100mg Rinderinsulin

H5-Medium für Analysen zur VEGF-Sekretion und Stimulationsversuche:

450 ml DMEM/HAM'S F-12 (1:1), w stable Glutamine

50 ml H5-Medium (10xStock)

5 ml Penicillin/Streptomycin 10000 U / 10000 µg/ml

FCS 10% (FGM):

450 ml DMEM/HAM'S F-12 (1:1), w/o L-Glutamine

50 ml Fetales Rinderserum, FCS

5 ml Penicillin/Streptomycin 10000 U / 10000 µg/ml

FCS 2%:

490 ml DMEM/HAM'S F-12 (1:1), w/o L-Glutamine

10 ml Fetales Rinderserum, FCS

5 ml Penicillin/Streptomycin 10000 U / 10000 µg/ml

7.1.2 Substanzen und Chemikalien

Acrylamid/Bis, Rotiphorese GEL30	Roth GmbH & Co KG, Deutschland
Amersham ECL Western Blocking Analysis	GE Healthcare, UK
Aprotinin	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
Aqua ad iniectabilia	Delta Select
Ammoniumpersulfat [(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈]	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
BSA, Rinderserumalbumin RIA, für WB	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
BSA, Rinderserumalbumin für ELISA	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
β-Mercaptoethanol (C ₂ H ₆ OS)	Roth GmbH & Co KG, Deutschland
Bromphenolblau	Roth GmbH & Co KG, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat-2-Hydrat (Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O)	Merck KGaA, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck KGaA, Deutschland
Natrium-di-hydrogenphosphat-2-Hydrat (NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O)	Merck KGaA, Deutschland
Natrium-di-hydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck KGaA, Deutschland
DMSO [(CH ₃) ₂ SO]	Wak Chemie medical, Deutschland
EGF, rekombinant aus E. coli	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland

Ethanol (C ₂ H ₅ OH)	Riedel-de Haen GmbH, Deutschland
Glycerin, wasserfrei (C ₃ H ₈ O ₃)	Roth GmbH & Co KG, Deutschland
Glycin	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
Isopropanol (C ₃ H ₈ O)	Acros Organics, U.S.A.
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth GmbH & Co KG, Deutschland
Magermilchpulver 5%	Sigma, Deisenhofen
Methanol (CH ₃ OH)	Riedel-de Haen GmbH, Deutschland
MTT-Reagenz	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
Natronlauge (NaOH)	Merck KGaA, Deutschland
Natriumazid, reinst (NaN ₃)	Merck KGaA, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Roth GmbH & Co KG, Deutschland
Natriumdesoxycholat (C ₂₄ H ₃₉ NaO ₄)	Roth GmbH & Co KG, Deutschland
Nonidet P40	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Orthovanadate	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
PMSF	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
Prestained Protein Marker, Broad Range	BioLabs, U.S.A.
Saccharose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	Merck KGaA, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Merck KGaA, Deutschland
SDS ultra pure (C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S)	Roth GmbH & Co KG, Deutschland
Schwefelsäure, konzentriert (H ₂ SO ₄)	Merck KGaA, Deutschland
TEMED (C ₆ H ₁₂ N ₂)	Roth GmbH & Co KG, Deutschland
TRIS-Base (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Roth GmbH & Co KG, Deutschland
TRIS-HCL, pH 6,8	Roth GmbH & Co KG, Deutschland
TWEEN 20	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
Western Blocking Reagent	Roche Diagnostics, Deutschland
Work Bench, Hera Safe Typ: HS12	Heraeus, Deutschland
Wasserbad Typ: 1002 GFL	GFL mbH, Deutschland
Waage Typ: 2254	Sartorius AG, Deutschland

7.1.3 Kits und Antikörper

7.1.3.1 Kits

Amersham ECL Westernblotting Detection Kit

GE Healthcare, UK

Caspase -Glo 3/7 Assay

Promega-, U.S.A.

Im Set enthalten:

1x 2,5 ml Caspase- Glo 3/7 Puffer

1 Flasche Caspase- Glo 3/7 Substrat

Human Apoptosis Array Kit (ARY009)

R&D Systems U.S.A

Im Set enthalten:

Detektion Antikörpercocktail

Lysepuffer 15

Array Puffer 1

1x Array Puffer 2/3

1x Waschpuffer

Nuclear Extract Kit (40010)

Active Motif, U.S.A

Im Set enthalten:

Lysepuffer AM1

1M Dithiothreitol (DTT)

Protease Inhibitor Cocktail

10x PBS

0,1M phosphate Puffer, pH 7,5

1,5 M NaCl

27mM KCL

Phosphatase Inhibitors

125mM NaF

250mM β -glycerolphos

250mM paranitrophenylphosphat

25mM NaVO₃

10x Hypotonischer Puffer

20mM Hepes, pH

7,5mM NaF

10 μ M Na₂MoO₄

0,1mM EDTA

Detergenz

Anzusetzen:

PBS/Phosphatase Inhibitors

10x PBS

10xPBS 0,8 ml

Destilliertes Wasser

6,8 ml

Phosphatase Inhibitor

0,4 ml

1xHypotonischer Puffer

10x Hypotonischer Puffer	50 µl
Destilliertes Wasser	450 µl
Kompletter Lysepuffer	
10mM DTT	5,0 µl
Lysepuffer AM1	44,5 µl
Protease inhibitor Cocktail	0,5 µl
<u>NFκB p65 Transcription Factor Assay Kit</u>	Active Motif,U.S.A
Im Set enthalten:	
NFκB p65 Antikörper	
Anti-Kaninchen HRP-konjugierter IgG	
Wild-Typ Oligonukleotid AM20	
Mutiertes Oligonukleotid AM20	
Positiv Kontrolle Nuklear Extrakt	
Dithiothreitol (DTT)	
Protease Inhibitor Cocktail	
Herring sperm DNA	
Lysepuffer AM2	
Bindpuffer AM3	
10x Waschpuffer AM2	
10x Antikörperbindungspuffer AM2	
Entwicklungslösung	
Stopplösung	
96-well-NFκB assay plate	
Plate sealer	
Anzusetzen für 1 well:	
Kompletter Lysepuffer	DTT
	Protease Inhibitor Cocktail
	Lysepuffer AM2
Kompletter Bindpuffer	DTT
	Herring sperm DNA
	Bindpuffer AM3
1x Waschpuffer	destilliertes Wasser

1x Antikörperbindungspuffer
 10x Waschpuffer AM2
 destilliertes Wasser
 10x Antikörperbindung
 PufferAM2

7.1.3.2 Antikörper

Primärantikörper

Antikörper	Firma	Bezeichnung	Quelle	Bestell-Nr.
CHOP	CellSignaling	L63F7	Maus,mAk (IgG)	2895S
BiP/GRP78	BD Bioscience	Clone 40	Maus,mAk (BiP/GRP78)	610978
β-Actin	Sigma-Aldrich	clone AC-74	Maus, mAk	A2228

Sekundärantikörper

Antikörper	Firma	Konfiguration	Quelle	Bestell-Nr.
Anti-Maus	DakoCytomation	HRP konjugiert	Ziege, pAk	P0447

7.1.4 Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen für ELISA

10 x PBS (steril filtriert)
 137 mM NaCl
 2,7 mM KCl
 8,1mM Na₂HPO₄ 2H₂O
 1,5mM KH₂PO₄
 pH-Wert 7,2 bis 7,4

1 x PBS
 10 x PBS 1:10 mit Aqua bidest verdünnt

Waschpuffer 0,05%
 0,05% Tween 20 in 1 x PBS
 pH-Wert 7,2 bis 7,4

Blockpuffer
 1% BSA
 5% Saccharose
 0,05% Natriumazid

Verdünnungsreagenz (steril filtriert)	1% BSA in 1 x PBS pH-Wert 7,2 bis 7,4
Substrat Lösung	1:1 Gemisch aus Lösung A und B
Stopp Lösung	2N H ₂ SO ₄

Puffer und Lösungen für Proteinchemie

PBS für RIPA-Puffer	9,1 mM Na ₂ HPO ₄ 1,7 mM NaH ₂ PO ₄ 150 mM NaCl pH-Wert auf 7,4 mit NaOH einstellen
---------------------	--

RIPA-Puffer	PBS 1% Nonidet P40 0,5% Natriumdesoxycholat 0,1% SDS
-------------	---

10% SDS	SDS ultra pure 1:10 in Aqua bidest
---------	------------------------------------

25% APS	APS in Aqua bidest lösen
---------	--------------------------

Probepuffer	3,55 ml Bidest 2,5 ml Glycerin 2,0 ml 10% SDS 1,25 ml 1M Tris-HCl pH 6,8 0,2 ml 0,5 % Bromphenolblau
-------------	--

Zum Gebrauch:	475 µl Probepuffer + 25 µl β-Mercaptoethanol
---------------	--

10 x Laufpuffer pH 8,3	30 g Tris Base 144 g Glycin 10 g SDS ultra pure
------------------------	---

1 x Laufpuffer pH 8,3	10 x Laufpuffer 1:10 mit Aqua bidest verdünnt
-----------------------	---

10 x Transferpuffer pH 9	58,2 g Tris base 29,3 g Glycin
--------------------------	-----------------------------------

1 x Transferpuffer pH 9	10 x Transferpuffer 1:10 mit Aqua bidest verdünnt. Zu 1 Liter 1 x Transferpuffer wurden 3,75 ml 10% SDS hinzugefügt.
10 x TBS	12 g Tris base 87,6 g NaCl pH-Wert auf 8 mit HCl einstellen
1 x TBS	10 x TBS 1:10 mit Aqua bidest verdünnt
TTBS 0,05%	10 x TBS 1:10 mit Aqua bidest verdünnt 0,05% Tween 20
Stripping Puffer	7,01 ml β -Mercaptoethanol 20 g SDS (2%) 62,5 ml 1M Tris HCl pH 6,7 1000 ml Aqua bidest
Lösungen für MTT-Assay	
MTT-Reagenz	PBS 1 mg/ml MTT-Reagenz steril filtriert, lichtgeschützt
Stopplösung	85 ml Isopropanol 15 ml SDS 20% 0,4 ml 10M HCL

7.1.5 Geräte und Einwegmaterial

Abdeckfolien, Plate Sealers	Corning Inc., U.S.A.
Analysenwaage Explorer T2914	Ohaus, Schweiz
Bechergläser, Erlenmeyerkolben, Rundkolben	Schott Duran GmbH, Deutschland
Stehkolben, Laborflaschen, Reagenzgläser,	Schott Duran GmbH, Deutschland
Messzylinder, Mischzylinder, Schliffkolben	Schott Duran GmbH, Deutschland
Elektrophoresekammer, Glasplatten kurz, lang	BioRad, U.S.A.
ELISA Reader, Emax precision	Molecular Devices, U.S.A.
Filterpapier, Extra Thick 7,5x10 cm	BioRad, U.S.A.
Filmkassette, Ortho Regular Curix screens	AGFA, Deutschland

Film-Entwicklermaschine Optimax	Protec GmbH, Deutschland
Flachpinzette	Bochem, Deutschland
Horizontalshaker	Sigma- Aldrich GmbH, Deutschland
Inkubator Typ: B5061 EK-CO2	Heraeus, Deutschland
Kühlzentrifuge, Centrifuge 5415R	Eppendorf GmbH, Deutschland
Loading Tips, Aerosol Resistant Tips	Molecular Bio-Products, U.S.A.
Luminometer, GloMax Multitmode Reader	Promega, Mannheim Deutschland
Membranfilter 0,22µm Durapore	Millipore, U.S.A.
Mikroskop Typ: 020-505.030	Wild Leitz GmbH, Portugal
Mikroskop, Nikon TMS 302052	Nikon, Japan
Mikrotiterplatten 96-Well Polystyrol Costar	Corning Inc., U.S.A.
Multidish 4- well, Polystyrene	Thermo Scientific
Nitrocellulosemembran, Hybond ECL	Amersham Biosciences, Deutschland
Parafilm	Pechiney Plastic Packing, U.S.A.
pH-Meter Typ: 1121001 WinLab	Windaus Labortechnik, Deutschland
Pipetten, handbetrieben verschiedene Volumina	Eppendorf AG, Deutschland
Pipetten, akkubetrieben accujet pro	Brand, Deutschland
Pipettenspitzen bis 1000µl	Eppendorf AG, Deutschland
Pipettenspitzen 2 ml bis 20 ml für accujet pro	Greiner bio-one, Deutschland
Power Pac 200	BioRad, U.S.A.
Probenröhrchen 10ml	Greiner Labortechnik, Deutschland
Rotationsrüttler 4020	Köttermann, Deutschland
Rührmagnet Typ: 50310	Heidolph, Deutschland
Röntgenfilm, Kodak BioMax MR Film 13x18 cm	Kodak, U.S.A.
SemiDry TransferCell, Trans-Blot SD	BioRad, U.S.A.
Standardpetrischalen 92x16mm	Sarstedt AG & Co, Deutschland
Tischzentrifuge, Minifuge T	Heraeus, Deutschland
Tischzentrifuge, Function Line Labofuge 400R	Heraeus, Deutschland
Tischzentrifuge, Biofuge T	Heraeus, Deutschland
Ultraschallbad, Sonorex RK 100	Bandelin electronic, Deutschland
Vortexer, MS1 Minishaker	IKA Works Inc., U.S.A.
Work Bench, Hera Safe Typ: HS12	Heraeus, Deutschland
Wasserbad Typ: 1002 GFL	GFL mbH, Deutschland
Waage Typ: 2254	Sartorius AG, Deutschland
Zellkulturflaschen, Cellstar 175 cm ² und 75 cm ²	Greiner BioOne GmbH, Deutschland
175cm → 650 ml, 75cm → 250 ml	

Zellscraper	Greiner BioOne GmbH, Deutschland
Zentrifugenröhrchen, Cellstar 50 ml	Greiner BioOne GmbH, Deutschland
Zentrifugenröhrchen, Cellstar 15 ml	Greiner bioOne GmbH, Deutschland
24-Well-Platten, Costar Cell Culture Cluster	Corning Inc., U.S.A.
96-Well-Platten, Costar Cell Culture Cluster	Corning Inc., U.S.A.
96-Well- Platten, solid white flat bottom	Corning Inc., U.S.A
50 ml Reagenzien Reservoir, Costar	Corning Inc., U.S.A.
6 well Platten (FACS)	

7.2 Literaturverzeichnis

- Active Motif TransAM Transcription Factor ELISAs (DNA binding of activated transcription factors). (n.d.).[Internet] Zitiert am 22.Oktober 2012 URL: <http://www.activemotif.com/catalog/180/transam-transcription-factor-elisas>
- Adams, J. (2002). Preclinical and clinical evaluation of proteasome inhibitor PS-341 for the treatment of cancer. *Current opinion in chemical biology*, 6(4), 493–500.
- Adams, J. (2004a). The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nature reviews. Cancer*, 4(5), 349–60
- Adams, J. (2004b). The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs. *Cancer cell*, 5(5), 417–21.
- Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, Johnson J, Destree A, Lazarus DD, Maas J, Pien CS, Prakash S, Elliott PJ. (1999). Proteasome Inhibitors : A Novel Class of Potent and Effective Antitumor Agents *Cancer Research*, 59(11): 2615–2622.
- Aghajanian, C., Dizon, D. S., Sabbatini, P., Raizer, J. J., Dupont, J., & Spriggs, D. R. (2005). Phase I trial of bortezomib and carboplatin in recurrent ovarian or primary peritoneal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(25), 5943–9.
- Ain, K. B. (1999). Anaplastic thyroid carcinoma: a therapeutic challenge. *Seminars in surgical oncology*, 16(1), 64–9.
- Altmann, A., Markert, A., Askoxylakis, V., Schöning, T., Jesenofsky, R., Eisenhut, M., Haberkorn, U. (2012) Antitumor Effects of Proteasome Inhibition in Anaplastic Thyroid Carcinoma. *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine*, 53 (11), 1764-71
- Aschebrook-Kilfoy, B., Ward, M. H., Sabra, M. M., & Devesa, S. S. (2011). Thyroid cancer incidence patterns in the United States by histologic type, 1992-2006. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*, 21(2), 125–34.
- Baiz, D., Pozzato, G., Dapas, B., Farra, R., Scaggiante, B., Grassi, M., Uxa L, Giansante C, Zennaro C, Guarnieri G, Grassi, G. (2009). Bortezomib arrests the proliferation of hepatocellular carcinoma cells HepG2 and JHH6 by differentially affecting E2F1, p21 and p27 levels. *Biochimie*, 91(3), 373–82.
- Bancroft, C. C., Chen, Z., Dong, G., Sunwoo, J. B., Yeh, N., Park, C., & Van Waes, C. (2001). Coexpression of proangiogenic factors IL-8 and VEGF by human head and neck squamous cell carcinoma involves coactivation by MEK-MAPK and IKK-NF-kappaB signal pathways. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 7(2), 435–42.

- Bedford, L., Paine, S., Sheppard, P. W., Mayer, R. J., & Roelofs, J. (2010). Assembly, structure, and function of the 26S proteasome. *Trends in cell biology*, 20(7), 391–401.
- Befani, C. D., Vlachostergios, P. J., Hatzidaki, E., Patrikidou, A., Bonanou, S., Simos, G., Papandreou CN, Liakos, P. (2012). Bortezomib represses HIF-1 α protein expression and nuclear accumulation by inhibiting both PI3K/Akt/TOR and MAPK pathways in prostate cancer cells. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 90(1), 45–54.
- Berg, J. M., Timoczko J. L., Stryer L. Biochemistry. New York: Palgrave Macmillan; 7th edition. 2011, 703-710.
- Boccadoro, M., Morgan, G., & Cavenagh, J. (2005). Preclinical evaluation of the proteasome inhibitor bortezomib in cancer therapy. *Cancer cell international*, 5(1), 18.
- Boone, R. T., Fan, C.-Y., & Hanna, E. Y. (2003). Well-differentiated carcinoma of the thyroid. *Otolaryngologic clinics of North America*, 36(1), 73–90, viii.
- Breitschopf, K., Zeiher, A. M., & Dimmeler, S. (2000). Ubiquitin-mediated degradation of the proapoptotic active form of bcl-2. A functional consequence on apoptosis induction. *The Journal of biological chemistry*, 275(28), 21648–52.
- Caillou, B., Troalen, F., Baudin, E., Talbot, M., Filetti, S., Schlumberger, M., & Bidart, J. M. (1998). Na⁺/I⁻ symporter distribution in human thyroid tissues: an immunohistochemical study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 83(11), 4102–6.
- Calvaruso, G., Giuliano, M., Portanova, P., De Blasio, A., Vento, R., & Tesoriere, G. (2006). Bortezomib induces in HepG2 cells IkappaB α degradation mediated by caspase-8. *Molecular and cellular biochemistry*, 287(1-2), 13–9.
- Caspase-Glo® 3/7 Assay Systems, Technical Bulletin. [Internet] (2012). Zitiert am 04.April 2013, URL: <http://www.promega.de/resources/protocols/technical-bulletins/101/caspase-glo-37-assay-protocol/>
- Caravita, T., de Fabritiis, P., Palumbo, A., Amadori, S., & Boccadoro, M. (2006). Bortezomib: efficacy comparisons in solid tumors and hematologic malignancies. *Nature clinical practice. Oncology*, 3(7), 374–87.
- Chauhan, D., Hideshima, T., Mitsiades, C., Richardson, P., & Anderson, K. C. (2005). Minireview Proteasome inhibitor therapy in multiple myeloma. *Molecular Cancer Therapeutics*, 686–692.
- Chauhan, D., Li, G., Podar, K., Hideshima, T., Mitsiades, C., Schlossman, R. Munshi N, Richardson P., Cotter FE, Anderson, K. C. (2004). Targeting mitochondria to overcome conventional and bortezomib/proteasome inhibitor PS-341 resistance in multiple myeloma (MM) cells. *Blood*, 104(8), 2458–66.

- Chen, K.-F., Yeh, P.-Y., Hsu, C., Hsu, C.-H., Lu, Y.-S., Hsieh, H.-P., Chen P.J., Cheng, A.-L. (2009). Bortezomib overcomes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in hepatocellular carcinoma cells in part through the inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *The Journal of biological chemistry*, 284(17), 11121–33.
- Codony-Servat, J., Tapia, M. A., Bosch, M., Oliva, C., Domingo-Domenech, J., Mellado, B., Rolfe M., Ross J.S., Gascon P., Rovira A., Albanell, J. (2006). Differential cellular and molecular effects of bortezomib, a proteasome inhibitor, in human breast cancer cells. *Molecular cancer therapeutics*, 5(3), 665–75.
- Conticello, C., Adamo, L., Giuffrida, R., Vicari, L., Zeuner, A., Eramo, A., Anastasi G., Memeo L., Giuffrida D., Iannolo G., Gulisano M., De Maria, R. (2007). Proteasome inhibitors synergize with tumor necrosis factor-related apoptosis-induced ligand to induce anaplastic thyroid carcinoma cell death. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 92(5), 1938–42.
- Cooper, D. S., Doherty, G. M., Haugen, B. R., Hauger, B. R., Kloos, R. T., Lee, S. L., Mandel SJ, Mazzaferri EL, McIver B, Pacini F, Schlumberger M, Sherman SI, Steward DL., Tuttle, R. M. (2009). Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*, 19(11), 1167–214.
- Cortes, J., Thomas, D., Koller, C., Giles, F., Estey, E., Faderl, S., Garcia-Manero G., McConkey D., Ruiz S.L., Guercioli R., Wright J., Kantarjian, H. (2004). Phase I study of bortezomib in refractory or relapsed acute leukemias. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 10(10), 3371–6.
- Cusack, J. C., Liu, R., Houston, M., Abendroth, K., Elliott, P. J., Adams, J., & Baldwin, A. S. (2001). Enhanced Chemosensitivity to CPT-11 with Proteasome Inhibitor PS-341 : Implications for Systemic Nuclear Factor- κ B Inhibition Advances in Brief *Cancer*, 3535–3540.
- Davies, L., & Welch, H. G. (2006). Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 295(18), 2164–7.
- De Wilt, L., Kroon, J., Jansen, G., de Jong, S., Peters, G.J., Kruijt, F.(2013). Bortezomib and TRAIL: a perfect match for apoptotic elimination of tumor cells? *Critical reviews in oncology/hematology* 85 (3), 363-72
- Dolcet, X., Llobet, D., Encinas, M., Pallares, J., Cabero, A., Schoenenberger, J. A., Comella J.X., Matias-Guiu, X. (2006). Proteasome inhibitors induce death but activate NF-kappaB on endometrial carcinoma cell lines and primary culture explants. *The Journal of biological chemistry*, 281(31), 22118–30.

- Dolcet, X., Llobet, D., Pallares, J., & Matias-Guiu, X. (2005). NF- κ B in development and progression of human cancer. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, 446(5), 475–82.
- Dong, Q. G., Sclabas, G. M., Fujioka, S., Schmidt, C., Peng, B., Wu, T., Tsao M.S., Evans D.B., Abbruzzes J.L., McDonnel T.J., Chiao, P. J. (2002). The function of multiple IkappaB : NF-kappaB complexes in the resistance of cancer cells to Taxol-induced apoptosis. *Oncogene*, 21(42), 6510–9.
- Drexler, H. C. (1997). Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(3), 855–60.
- Du, Z.-X., Zhang, H.-Y., Meng, X., Guan, Y., & Wang, H.-Q. (2009). Role of oxidative stress and intracellular glutathione in the sensitivity to apoptosis induced by proteasome inhibitor in thyroid cancer cells. *BMC cancer*, 9, 56.
- Einsele, H. (2010). Bortezomib. *Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progrès dans les recherches sur le cancer*, 184, 173–87.
- Fagin, J. A. (2004). How thyroid tumors start and why it matters: kinase mutants as targets for solid cancer pharmacotherapy. *The Journal of endocrinology*, 183(2), 249–56.
- Feinman, R., Koury, J., Thames, M., Barlogie, B., Epstein, J., & Siegel, D. S. (1999). Role of NF-kappaB in the rescue of multiple myeloma cells from glucocorticoid-induced apoptosis by bcl-2. *Blood*, 93(9), 3044–52.
- Fernández, Y., Verhaegen, M., Miller, T. P., Rush, J. L., Steiner, P., Opipari, A. W., Lowe S.W., Soengas, M. S. (2005). Differential regulation of noxa in normal melanocytes and melanoma cells by proteasome inhibition: therapeutic implications. *Cancer research*, 65(14), 6294–304.
- Fleury, C., Mignotte, B., & Vayssière, J.-L. (2002). Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie*, 84(2-3), 131–41.
- Foote, R. L., Molina, J. R., Kasperbauer, J. L., Lloyd, R. V, McIver, B., Morris, J. C., Grant C.S., Thompson G.B., Richards M.L., Hay I.D., Smallridge R.C., Bible, K. C. (2011). Enhanced survival in locoregionally confined anaplastic thyroid carcinoma: a single-institution experience using aggressive multimodal therapy. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*, 21(1), 25–30.
- Frankel, A., Man, S., Elliott, P., Adams, J., & Kerbel, R. S. (2000). Lack of multicellular drug resistance observed in human ovarian and prostate carcinoma treated with the proteasome inhibitor PS-341. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 6(9), 3719–28.
- Fribley, A., Zeng, Q., & Wang, C.-Y. (2004). Proteasome inhibitor PS-341 induces apoptosis through induction of endoplasmic reticulum stress-reactive oxygen

- species in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Molecular and cellular biology*, 24(22), 9695–704.
- Gabai, V. L., Meriin, A. B., Yaglom, J. A., Volloch, V. Z., & Sherman, M. Y. (1998). Role of Hsp70 in regulation of stress-kinase JNK: implications in apoptosis and aging. *FEBS letters*, 438(1-2), 1–4.
- Ghossein, R., & Livolsi, V. A. (2008). Papillary thyroid carcinoma tall cell variant. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*, 18(11), 1179–81.
- GE Helthcare Life Science (2012) Amersham ECL Western blotting detection reagents analysis system [Internet] zitiert am 22.10.2012
URL: https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314723116657/litdoc28955347AD_20110830195642.pdf
- Gibbs, J. B. (2000, March 17). Mechanism-based target identification and drug discovery in cancer research. *Science (New York, N.Y.)*.
- Goldberg, A. L. (2003). Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature*, 426(6968), 895–9.
- Gordon, G. J., Mani, M., Maulik, G., Mukhopadhyay, L., Yeap, B. Y., Kindler, H. L., Salgia R., Sugarbaker D.J., Bueno, R. (2008). Preclinical studies of the proteasome inhibitor bortezomib in malignant pleural mesothelioma. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 61(4), 549–58.
- Groll, M., Heinemeyer, W., Jäger, S., Ullrich, T., Bochtler, M., Wolf, D. H., & Huber, R. (1999). The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: a mutational and crystallographic study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(20), 10976–83.
- Groll, Michael, Berkers, C. R., Ploegh, H. L., & Ova, H. (2006). Crystal structure of the boronic acid-based proteasome inhibitor bortezomib in complex with the yeast 20S proteasome. *Structure (London, England : 1993)*, 14(3), 451–6.
- Hershko, A., & Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annual review of biochemistry*, 67, 425–79.
- Hideshima, T., Richardson, P., Chauhan, D., Palombella, V. J., Elliott, P. J., Adams, J., & Anderson, K. C. (2001). The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer research*, 61(7), 3071–6.
- Hideshima, Teru, Chauhan, D., Richardson, P., Mitsiades, C., Mitsiades, N., Hayashi, T., Munshi N., Dank L., Castro A., Palombella V., Adams J., Anderson, K. C. (2002). NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma. *The Journal of biological chemistry*, 277(19), 16639–47.

- Hideshima, Teru, Mitsiades, C., Akiyama, M., Hayashi, T., Chauhan, D., Richardson, P., Schlossmann R., Podar K., Munshi N.C., Mitsiades N., Anderson, K. C. (2003). Molecular mechanisms mediating antimyeloma activity of proteasome inhibitor PS-341. *Blood*, 101(4), 1530–4.
- Hideshima, Teru, Ikeda, H., Chauhan, D., Okawa, Y., Raje, N., Podar, K., Mitsiades C., Munshi N.C., Richardson P.G., Carrasco R.D., Anderson, K. C. (2009). Bortezomib induces canonical nuclear factor-kappaB activation in multiple myeloma cells. *Blood*, 114(5), 1046–52.
- Hock, A. K., Vigneron, A. M., Carter, S., Ludwig, R. L., & Vousden, K. H. (2011). Regulation of p53 stability and function by the deubiquitinating enzyme USP42. *The EMBO journal*, 30(24), 4921–30.
- Iqbal, M., Chatterjee, S., Kauer, J. C., Mallamo, J. P., Messina, P. A., Reiboldt, A., & Siman, R. (1996). Potent α -ketocarbonyl and boronic ester derived inhibitors of proteasome. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 6(3), 287–290.
- Jagannath, S, Barlogie, B., Berenson, J., Siegel, D., Irwin, D., Richardson, P. G., niesvizky R., Alexanian R., Limentani S.A., Alsina M., Adams J., Kauffman M., Esseltine D.L., Schenkein D.P., Anderson, K. C. (2004). A phase 2 study of two doses of bortezomib in relapsed or refractory myeloma. *British journal of haematology*, 127(2), 165–72.
- Jagannath, Sundar, Durie, B. G. M., Wolf, J., Camacho, E., Irwin, D., Lutzky, J., McKinley M., Gabayan E., Mazumder A., Schenkein D., Crowley, J. (2005). Bortezomib therapy alone and in combination with dexamethasone for previously untreated symptomatic multiple myeloma. *British journal of haematology*, 129(6), 776–83.
- Johnson, D., (2014). The ubiquitin-proteasome system: opportunities for therapeutic intervention in solid tumors. *Endocrine-related cancer*, March 1-45
- Johnson, T. L., Lloyd, R. V, Thompson, N. W., Beierwaltes, W. H., & Sisson, J. C. (1988). Prognostic implications of the tall cell variant of papillary thyroid carcinoma. *The American journal of surgical pathology*, 12(1), 22–7.
- Karin, M., Cao, Y., Greten, F. R., & Li, Z.-W. (2002). NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nature reviews. Cancer*, 2(4), 301–10.
- Karin, M., Yamamoto, Y., & Wang, Q. M. (2004). The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. *Nature reviews. Drug discovery*, 3(1), 17–26.
- Karp, G. Molekulare Zellbiologie. Berlin: Springer, 2005, 363-380
- Kim, T. (2012). Bortezomib induces G2-M arrest in human colon cancer cells through ROS-inducible phosphorylation of ATM-CHK1. *International Journal of Oncology*, 41(1), 76–82.

- Kisselev, a F., & Goldberg, a L. (2001). Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chemistry & biology*, 8(8), 739–58.
- Köhler, A., Cascio, P., Leggett, D. S., Woo, K. M., Goldberg, A. L., & Finley, D. (2001). The Axial Channel of the Proteasome Core Particle Is Gated by the Rpt2 ATPase and Controls Both Substrate Entry and Product Release. *Molecular Cell*, 7(6), 1143–1152.
- Köhrle, J. (2004). Guard your master: thyroid hormone receptors protect their gland of origin from thyroid cancer. *Endocrinology*, 145(10), 4427–9.
- Kondagunta, G. V., Drucker, B., Schwartz, L., Bacik, J., Marion, S., Russo, P., Mazumdar M., Motzer, R. J. (2004). Phase II trial of bortezomib for patients with advanced renal cell carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 22(18), 3720–5.
- Kondo, T., Ezzat, S., & Asa, S. L. (2006). Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nature reviews. Cancer*, 6(4), 292–306.
- Kubbutat, M. H., Jones, S. N., & Vousden, K. H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*, 387(6630), 299–303.
- Kuerbitz, S. J., Plunkett, B. S., Walsh, W. V., & Kastan, M. B. (1992). Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(16), 7491–5.
- Kumar, S. K., Flinn, I., Noga, S. J., Hari, P., Rifkin, R., Callander, N., Bhandari M., Wolf J.L., Gasparetto C., Krishnan A., Grosman D., Glass J., Sahovic E.A., Shi H., Webb I.J., Richardson P.G., Rajkumar, S. V. (2010). Bortezomib, dexamethasone, cyclophosphamide and lenalidomide combination for newly diagnosed multiple myeloma: phase 1 results from the multicenter EVOLUTION study. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 24(7), 1350–6.
- Landowski, T. H., Megli, C. J., Nullmeyer, K. D., Lynch, R. M., & Dorr, R. T. (2005). Mitochondrial-mediated dysregulation of Ca²⁺ is a critical determinant of Velcade (PS-341/bortezomib) cytotoxicity in myeloma cell lines. *Cancer research*, 65(9), 3828–36.
- Lashinger, L. M., Zhu, K., Williams, S. A., Shrader, M., Dinney, C. P. N., & McConkey, D. J. (2005). Bortezomib abolishes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance via a p21-dependent mechanism in human bladder and prostate cancer cells. *Cancer research*, 65(11), 4902–8.
- Li, B., & Dou, Q. P. (2000). Bax degradation by the ubiquitin/proteasome-dependent pathway: involvement in tumor survival and progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(8), 3850–5.

- Ling, Y.-H., Liebes, L., Jiang, J.-D., Holland, J. F., Elliott, P. J., Adams, J., Muggia F.M., Perez-Soler, R. (2003). Mechanisms of proteasome inhibitor PS-341-induced G(2)-M-phase arrest and apoptosis in human non-small cell lung cancer cell lines. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 9(3), 1145–54.
- Ling, Y.-H., Liebes, L., Zou, Y., & Perez-Soler, R. (2003). Reactive oxygen species generation and mitochondrial dysfunction in the apoptotic response to Bortezomib, a novel proteasome inhibitor, in human H460 non-small cell lung cancer cells. *The Journal of biological chemistry*, 278(36), 33714–23.
- Liu, J., Qu, X.-J., Xu, L., Zang, Y., Qu, J.-L., Hou, K.-Z., & Liu, Y.-P. (2010). Bortezomib synergizes TRAIL-induced apoptosis in gastric cancer cells. *Digestive diseases and sciences*, 55(12), 3361–8.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Bretscher, A., Ploegh H., Matsudaira, P. *Molecular Cell Biology*. New York: W. H. Freeman; 2007, 86-89
- Loercher, A., Lee, T. L., Ricker, J. L., Howard, A., Geoghegan, J., Chen, Z., Sunwoo J.B., Sitcheran R., Chuang E.Y., Mitchell J.B., Baldwin A.S., Van Waes, C. (2004). Nuclear factor-kappaB is an important modulator of the altered gene expression profile and malignant phenotype in squamous cell carcinoma. *Cancer research*, 64(18), 6511–23.
- Lopes, U. G., Erhardt, P., Yao, R., & Cooper, G. M. (1997). p53-dependent induction of apoptosis by proteasome inhibitors. *The Journal of biological chemistry*, 272(20), 12893–6
- Ludwig, L., Kessler, H., Wagner, M., Hoang-Vu, C., Dralle, H., Adler, G., Böhm B.O., Schmid, R. M. (2001). Nuclear factor-kappaB is constitutively active in C-cell carcinoma and required for RET-induced transformation. *Cancer research*, 61(11), 4526–35.
- Ma, M. H., Yang, H. H., Parker, K., Manyak, S., Friedman, J. M., Altamirano, C., Wu Z.Q., Borad M.J., Frantzen M., Roussos E., Neeser J., Mikail A., Adams J., Sjak-Shie N., Vescio R.A., Berenson, J. R. (2003). The proteasome inhibitor PS-341 markedly enhances sensitivity of multiple myeloma tumor cells to chemotherapeutic agents. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 9(3), 1136–44.
- MacLaren, A. P., Chapman, R. S., Wyllie, A. H., & Watson, C. J. (2001). p53-dependent apoptosis induced by proteasome inhibition in mammary epithelial cells. *Cell death and differentiation*, 8(3), 210–8.
- Maki, C. G., Huibregtse, J. M., & Howley, P. M. (1996). In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53(1). *Cancer research*, 56(11), 2649–54.
- Markovic, S. N., Geyer, S. M., Dawkins, F., Sharfman, W., Albertini, M., Maples, W., Fracasso P. M., Fitch T., Lorusso P., Adjei A. A., Erlichman, C. (2005). A phase II

- study of bortezomib in the treatment of metastatic malignant melanoma. *Cancer*, 103(12), 2584–9.
- Markovina, S., Callander, N. S., O'Connor, S. L., Kim, J., Werndli, J. E., Raschko, M., Leith C. P., Kahl B. S., Kim K., Miyamoto, S. (2008). Bortezomib-resistant nuclear factor-kappaB activity in multiple myeloma cells. *Molecular cancer research : MCR*, 6(8), 1356–64.
- Marques, A. R., Espadinha, C., Catarino, A. L., Moniz, S., Pereira, T., Sobrinho, L. G., & Leite, V. (2002). Expression of PAX8-PPAR gamma 1 rearrangements in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 87(8), 3947–52.
- Masdehors, P., Merle-Béral, H., Magdelénat, H., & Delic, J. (2000). Ubiquitin-proteasome system and increased sensitivity of B-CLL lymphocytes to apoptotic death activation. *Leukemia & lymphoma*, 38(5-6), 499–504.
- Mateos, M.-V., Richardson, P. G., Schlag, R., Khuageva, N. K., Dimopoulos, M. A., Shpilberg, O., Kropff M., Spicka I., Petrucci M.T., Palumbo A., Samoilova O. S., Dmoszynska A., Abdulkadryov K.M., Schots R., Jiang B., Esseltine D. L., Liu K., Cakana A., van de Velde H., San Miguel, J. F. (2010). Bortezomib plus melphalan and prednisone compared with melphalan and prednisone in previously untreated multiple myeloma: updated follow-up and impact of subsequent therapy in the phase III VISTA trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(13), 2259–66.
- McCarthy, R. P., Wang, M., Jones, T. D., Strate, R. W., & Cheng, L. (2006). Molecular evidence for the same clonal origin of multifocal papillary thyroid carcinomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 12(8), 2414–8.
- Medema, R. H., & Bos, J. L. (1993). The role of p21ras in receptor tyrosine kinase signaling. *Critical reviews in oncogenesis*, 4(6), 615–61.
- Mitsiades, C. S., Hayden, P., Kotoula, V., McMillin, D. W., McMullan, C., Negri, J., Delmore J.E., Poulaki V., Mitsiades, N. (2007). Bcl-2 overexpression in thyroid carcinoma cells increases sensitivity to Bcl-2 homology 3 domain inhibition. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 92(12), 4845–52.
- Mitsiades, C. S., McMillin, D., Kotoula, V., Poulaki, V., McMullan, C., Negri, J., Fanourakis G., Tseleni-Balafouta S., Ain K. B., Mitsiades, N. (2006). Antitumor effects of the proteasome inhibitor bortezomib in medullary and anaplastic thyroid carcinoma cells in vitro. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 91(10), 4013–21.
- Mitsiades, N., Mitsiades, C. S., Poulaki, V., Chauhan, D., Fanourakis, G., Gu, X., Bailey C., Joseph M., Libermann T.A., Treon S.P., MUnshi N. C., Richardson P.

- G., Hideshima T., Anderson, K. C. (2002). Molecular sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(22), 14374–9.
- Mitsiades, N., Mitsiades, C. S., Poulaki, V., Chauhan, D., Richardson, P. G., Hideshima, T., Munshi N., Treon S. P., Anderson, K. C. (2002). Biologic sequelae of nuclear factor-kappaB blockade in multiple myeloma: therapeutic applications. *Blood*, 99(11), 4079–86.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1), 55–63.
- Mujtaba, T., & Dou, Q. P. (2011). Advances in the understanding of mechanisms and therapeutic use of bortezomib. *Discovery medicine*, 12(67), 471–80.
- Nawrocki, S. T., Carew, J. S., Dunner, K., Boise, L. H., Chiao, P. J., Huang, P., Abbruzzes J. L., McConkey, D. J. (2005a). Bortezomib inhibits PKR-like endoplasmic reticulum (ER) kinase and induces apoptosis via ER stress in human pancreatic cancer cells. *Cancer research*, 65(24), 11510–9.
- Nawrocki, S. T., Carew, J. S., Pino, M. S., Highshaw, R. A., Dunner, K., Huang, P., Abbruzzes J. L., McConkey, D. J. (2005b). Bortezomib sensitizes pancreatic cancer cells to endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis. *Cancer research*, 65(24), 11658–66.
- Németh, Z. H., Wong, H. R., Odoms, K., Deitch, E. A., Szabó, C., Vizi, E. S., & Haskó, G. (2004). Proteasome inhibitors induce inhibitory kappa B (I kappa B) kinase activation, I kappa B alpha degradation, and nuclear factor kappa B activation in HT-29 cells. *Molecular pharmacology*, 65(2), 342–9.
- Nickeleit, I., Zender, S., Sasse, F., Geffers, R., Brandes, G., Sörensen, I., Steinmetz H., Kubicka S., Carlomagno T., Menche D., Gütgemann I., Buer J., Gossler A., Manns M. P., Kalesse M., Frank R., Malek, N. P. (2008). Argyrin a reveals a critical role for the tumor suppressor protein p27(kip1) in mediating antitumor activities in response to proteasome inhibition. *Cancer cell*, 14(1), 23–35.
- Nikiforov, M. A., Riblett, M., Tang, W.-H., Gratchouck, V., Zhuang, D., Fernandez, Y., Verhaegen M., Varambally S., Chinnaiyan A. M., Jakubowiak A. J., Soengas, M. S. (2007). Tumor cell-selective regulation of NOXA by c-MYC in response to proteasome inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(49), 19488–93.
- Obeng, E. A., Carlson, L. M., Gutman, D. M., Harrington, W. J., Lee, K. P., & Boise, L. H. (2006). Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood*, 107(12), 4907–16.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino T., Taniguchi T., Tanaka, N. (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family

- and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science (New York, N.Y.)*, 288(5468), 1053–8.
- Oerlemans, R., Franke, N. E., Assaraf, Y. G., Cloos, J., van Zantwijk, I., Berkers, C. R., Scheffler G. L., Debipersad K., Vojtekova K., Lemos C., van der Heijden J. W., Ylstra B., Peters G. J., Kaspers G. L., Dijkmans B. A., Scheper R. J., Jansen, G. (2008). Molecular basis of bortezomib resistance: proteasome subunit beta5 (PSMB5) gene mutation and overexpression of PSMB5 protein. *Blood*, 112(6), 2489–99.
- Orlowski, R. Z., Eswara, J. R., Lafond-walker, A., Dang, C. V, Grever, M. R., & Orlowski, M. (1998). Tumor Growth Inhibition Induced in a Murine Model of Human Burkitt ' s Lymphoma by a Proteasome Inhibitor Tumor Growth Inhibition Induced in a Murine Model of Human Burkitt ' s Lymphoma by a Proteasome Inhibitor1. *Cancer*, 4342–4348.
- Orlowski, R. Z., Voorhees, P. M., Garcia, R. A., Hall, M. D., Kudrik, F. J., Allred, T., Johri A. R., Jones P. E., Ivanova A., Van deventer H. W., Gabriel D. A., Shea T. C., Mitchell B. S., Adams J., Esseltine D. L., Trehu E. G., Green M., Lehman M. J., Natoli S., Collins J.M., Lindley C. M., Dees, E. C. (2005). Phase 1 trial of the proteasome inhibitor bortezomib and pegylated liposomal doxorubicin in patients with advanced hematologic malignancies. *Blood*, 105(8), 3058–65.
- Pacifico, F., Mauro, C., Barone, C., Crescenzi, E., Mellone, S., Monaco, M., Chiappetta G., Terrazzano G., Liquoro D., Vito P., Consiglio E., Formisano S., Leonardi, A. (2004). Oncogenic and anti-apoptotic activity of NF-kappa B in human thyroid carcinomas. *The Journal of biological chemistry*, 279(52), 54610–9.
- Pacini, F., Schlumberger, M., Dralle, H., Elisei, R., Smit, J. W. A., & Wiersinga, W. (2006). European consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, 154(6), 787–803.
- Pal, T., Vogl, F. D., Chappuis, P. O., Tsang, R., Brierley, J., Renard, H., Sanders K., Kantemiroff T., Bagha S., Goldgar D. E., Narod S. A., Foulkes, W. D. (2001). Increased risk for nonmedullary thyroid cancer in the first degree relatives of prevalent cases of nonmedullary thyroid cancer: a hospital-based study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 86(11), 5307–12.
- Pallares, J., Martínez-Guitarte, J. L., Dolcet, X., Llobet, D., Rue, M., Palacios, J., Prat J., Matias-Guiu, X. (2004). Abnormalities in the NF-kappaB family and related proteins in endometrial carcinoma. *The Journal of pathology*, 204(5), 569–77.
- Palumbo, A., Bringhen, S., Rossi, D., Cavalli, M., Larocca, A., Ria, R., Offidani M., Patriarca F., Nozzoli C., Gugliemelli T., Benevolo G., Callea V., Baldini L., Morabito F., Grasso M., Leonardi G., Rizzo M., Falcone A. P., Gottaardi D., Montefusco V., Musto P., Petrucci M. T., Ciccone G., Boccadoro, M. (2010). Bortezomib-melphalan-prednisone-thalidomide followed by maintenance with bortezomib-thalidomide compared with bortezomib-melphalan-prednisone for

- initial treatment of multiple myeloma: a randomized controlled trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(34), 5101–9.
- Papandreou, C. N., Daliani, D. D., Nix, D., Yang, H., Madden, T., Wang, X., Pien C. S., Millikan R. E., Tu S. M., Pagliaro L., Kim J., Adams J., Elliot P., Esseltine D., Petrusich A., Dieringer P., Perez C., Logothetis, C. J. (2004). Phase I trial of the proteasome inhibitor bortezomib in patients with advanced solid tumors with observations in androgen-independent prostate cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 22(11), 2108–21.
- Pellegriti, G., Scollo, C., Lamera, G., Regalbuto, C., Vigneri, R., & Belfiore, A. (2004). Clinical behavior and outcome of papillary thyroid cancers smaller than 1.5 cm in diameter: study of 299 cases. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 89(8), 3713–20.
- Pérez-Galán, P., Roué, G., Villamor, N., Montserrat, E., Campo, E., & Colomer, D. (2006). The proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in mantle-cell lymphoma through generation of ROS and Noxa activation independent of p53 status. *Blood*, 107(1), 257–64.
- Peters, J. M., Franke, W. W., & Kleinschmidt, J. a. (1994). Distinct 19 S and 20 S subcomplexes of the 26 S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. *The Journal of biological chemistry*, 269(10), 7709–18.
- Pickart, C. M., & Eddins, M. J. (2004). Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochimica et biophysica acta*, 1695(1-3), 55–72.
- Podar, K., Shringarpure, R., Tai, Y.-T., Simoncini, M., Sattler, M., Ishitsuka, K., Richardson P. G., Hideshima T., Chauhan D., Anderson, K. C. (2004). Caveolin-1 is required for vascular endothelial growth factor-triggered multiple myeloma cell migration and is targeted by bortezomib. *Cancer research*, 64(20), 7500–6.
- Poulaki, V., Mitsiades, C. S., Kotoula, V., Tseleni-Balafouta, S., Ashkenazi, A., Koutras, D. A., & Mitsiades, N. (2002). Regulation of Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in thyroid carcinoma cells. *The American journal of pathology*, 161(2), 643–54.
- Proteome Profiler Human Apoptosis Array Kit - ary009.pdf. [Internet](2012). Zitiert am 04. April 2013, URL: <http://www.rndsystems.com/pdf/ary009.pdf>
- Qin, J.-Z., Ziffra, J., Stennett, L., Bodner, B., Bonish, B. K., Chaturvedi, V., Bennett F., Pollock P. M., trent J. M., Hendrix M. J., Rizzo P., Miele L., Nickoloff, B. J. (2005). Proteasome inhibitors trigger NOXA-mediated apoptosis in melanoma and myeloma cells. *Cancer research*, 65(14), 6282–93.

- Quiros, R. M., Ding, H. G., Gattuso, P., Prinz, R. A., & Xu, X. (2005). Evidence that one subset of anaplastic thyroid carcinomas are derived from papillary carcinomas due to BRAF and p53 mutations. *Cancer*, 103(11), 2261–8.
- Rayet, B., & Gélinas, C. (1999). Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene*, 18(49), 6938–47.
- Rassow J., Hauser, K., Netzker R., Deutzmann, R. Biochemie Stuttgart: Georg Thieme Verlag (2008), 379-381.
- Reiners, C., Geling, M., Luster, M., Farahati, J., & M  der, U. (2005). Epidemiologie des Schilddrüsenkarzinoms. *Der Onkologe*, 11(1), 11–19.
- Ricarte-Filho, J. C., Ryder, M., Chitale, D. A., Rivera, M., Heguy, A., Ladanyi, M., Janakiraman M., Solit D., Knauf J. A., Tuttle R. M., Ghossein R. A., Fagin, J. A. (2009). Mutational profile of advanced primary and metastatic radioactive iodine-refractory thyroid cancers reveals distinct pathogenetic roles for BRAF, PIK3CA, and AKT1. *Cancer research*, 69(11), 4885–93.
- Richardson, P. G., Barlogie, B., Berenson, J., Singhal, S., Jagannath, S., Irwin, D., Rajkumar S. V., Srkalovic G., Alsina M., Alexanian R., Siegel D., Orlowski R. Z., Kuter D., Limentani S. A., Lee S., Hideshima T., Esseltine D. L., Kauffman M., Adams J., Schenkein D. P., Anderson, K. C. (2003a). A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *The New England journal of medicine*, 348(26), 2609–17.
- Richardson, P. G., Hideshima, T., & Anderson, K. C. (2003b). Bortezomib (PS-341): a novel, first-in-class proteasome inhibitor for the treatment of multiple myeloma and other cancers. *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center*, 10(5), 361–9.
- Richardson, P. G., Sonneveld, P., Schuster, M. W., Irwin, D., Stadtmauer, E. A., Facon, T., Harousseau JL, Ben-Yehuda D, Lonial S, Goldschmidt H, Reece D, San-Miguel JF, Blad   J, Boccadoro M, Cavenagh J, Dalton WS, Boral AL, Esseltine DL, Porter JB, Schenkein D, Anderson, K. C. (2005). Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *The New England journal of medicine*, 352(24), 2487–98.
- Rivett, A. J. (1989). The multicatalytic proteinase. Multiple proteolytic activities. *The Journal of biological chemistry*, 264(21), 12215–9.
- Ruschak, A. M., Slassi, M., Kay, L. E., & Schimmer, A. D. (2011). Novel Proteasome Inhibitors to Overcome Bortezomib Resistance. *Journal of the National Cancer Institute*, 1007–1017.
- Rusinek, D., Szpak-Ulczo  k, S., & Jarzab, B. (2011). Gene expression profile of human thyroid cancer in relation to its mutational status. *Journal of molecular endocrinology*, 47(3), R91–103.

- Russo, S. M., Tepper, J. E., Baldwin, A. S., Liu, R., Adams, J., Elliott, P., & Cusack, J. C. (2001). Enhancement of radiosensitivity by proteasome inhibition: implications for a role of NF-kappaB. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 50(1), 183–93.
- Saeki, Y., & Tanaka, K. (2012). Assembly and function of the proteasome. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 832, 315–37.
- San Miguel, J. F., Schlag, R., Khuageva, N. K., Dimopoulos, M. A., Shpilberg, O., Kropff, M., Spicka I, Petrucci MT, Palumbo A, Samoilova OS, Dmoszynska A, Abdulkadyrov KM, Schots R, Jiang B, Mateos MV, Anderson KC, Esseltine DL, Liu K, Cakana A, van de Velde H., Richardson, P. G. (2008). Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *The New England journal of medicine*, 359(9), 906–17.
- Saulle, E., Petronelli, A., Pasquini, L., Petrucci, E., Mariani, G., Biffoni, M., Ferretti G., Scambia G., Benedetti-Panici P., Cognetti F., Humphreys R., Peschle C., Testa, U. (2007). Proteasome inhibitors sensitize ovarian cancer cells to TRAIL induced apoptosis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 12(4), 635–55.
- Schneider, A. B., & Sarne, D. H. (2005). Long-term risks for thyroid cancer and other neoplasms after exposure to radiation. *Nature clinical practice. Endocrinology & metabolism*, 1(2), 82–91.
- Seki, N., Toh, U., Sayers, T. J., Fujii, T., Miyagi, M., Akagi, Y., Kusukawa J., Kage M., Shirouzu K., Yamana, H. (2010). Bortezomib sensitizes human esophageal squamous cell carcinoma cells to TRAIL-mediated apoptosis via activation of both extrinsic and intrinsic apoptosis pathways. *Molecular cancer therapeutics*, 9(6), 1842–51.
- Shah, M. H., Young, D., Kindler, H. L., Webb, I., Kleiber, B., Wright, J., & Grever, M. (2004). Phase II study of the proteasome inhibitor bortezomib (PS-341) in patients with metastatic neuroendocrine tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 10(18 Pt 1), 6111–8.
- Shah, S. a, Potter, M. W., McDade, T. P., Ricciardi, R., Perugini, R. a, Elliott, P. J., Adams J., Callery, M. P. (2001). 26S proteasome inhibition induces apoptosis and limits growth of human pancreatic cancer. *Journal of cellular biochemistry*, 82(1), 110–22.
- Sherman, S. I. (2003). Thyroid carcinoma. *Lancet*, 361(9356), 501–11.
- Shinohara, K., Tomioka, M., Nakano, H., Toné, S., Ito, H., & Kawashima, S. (1996). Apoptosis induction resulting from proteasome inhibition. *The Biochemical journal*, 317 (Pt 2, 385–8.
- Shringarpure, R., Catley, L., Bhole, D., Burger, R., Podar, K., Tai, Y.-T., Kessler B., Galardy P., Ploegh H., Tassone P., Hideshima T., Mitsiades C., Munshi N. C.,

- Cauhan D., Anderson, K. C. (2006). Gene expression analysis of B-lymphoma cells resistant and sensitive to bortezomib. *British journal of haematology*, 134(2), 145–56.
- Smith, A. J., Dai, H., Correia, C., Takahashi, R., Lee, S.-H., Schmitz, I., & Kaufmann, S. H. (2011). Noxa/Bcl-2 protein interactions contribute to bortezomib resistance in human lymphoid cells. *The Journal of biological chemistry*, 286(20), 17682–92.
- Smith, D. M., Chang, S.-C., Park, S., Finley, D., Cheng, Y., & Goldberg, A. L. (2007). Docking of the proteasomal ATPases' carboxyl termini in the 20S proteasome's alpha ring opens the gate for substrate entry. *Molecular cell*, 27(5), 731–44.
- Stenner, F., Liewen, H., Zweifel, M., Weber, A., Tchinda, J., Bode, B., Saamaras P., Bauer S., Knuth A., Renner, C. (2008). Targeted therapeutic approach for an anaplastic thyroid cancer in vitro and in vivo. *Cancer science*, 99(9), 1847–52.
- Sunwoo, J. B., Chen, Z., Dong, G., Yeh, N., Crawl Bancroft, C., Sausville, E., Adams J., Elliott P., Van Waes, C. (2001). Novel proteasome inhibitor PS-341 inhibits activation of nuclear factor-kappa B, cell survival, tumor growth, and angiogenesis in squamous cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 7(5), 1419–28.
- Tan, C., & Waldmann, T. A. (2002). Proteasome inhibitor PS-341, a potential therapeutic agent for adult T-cell leukemia. *Cancer research*, 62(4), 1083–6.
- Teicher, B. A., Ara, G., Herbst, R., Palombella, V. J., & Adams, J. (1999). The Proteasome Inhibitor PS-341 in Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research*, 5(September), 2638–2645.
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1992). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology (Reading, Mass.)*, 24(9), 145–9.
- Tsuruta, F., Sunayama, J., Mori, Y., Hattori, S., Shimizu, S., Tsujimoto, Y., Yoshioka K., Masuyama N., Gotoh, Y. (2004). JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *The EMBO journal*, 23(8), 1889–99.
- U.S. Department of Health & Human Services. U.S. Food and Drug Administration United States Food and drug Administration Approval Summary: Bortezomib for the Treatment of Progressive Multiple Myeloma after One Prior Therapy (2006) [Internet] Zitiert am: 17.10.2013 URL: <http://www.fda.gov/downloads/aboutfda/centersoffices/officeofmedicalproductsanddtobacco/cder/ucm103300.pdf>
- U.S. National Institutes of Health (2012) ClinicalTrials.gov [Internet] Zitiert am: 17.10.2012 URL:<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=Bortezomib&Search=Search>

- Voorhees, P. M., Dees, E. C., Neil, B. O., & Orlowski, R. Z. (2003). The Proteasome as a Target for Cancer Therapy The Proteasome as a Target for Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research*, 6316–6325.
- Voortman, J., Smit, E. F., Honeywell, R., Kuenen, B. C., Peters, G. J., van de Velde, H., & Giaccone, G. (2007). A parallel dose-escalation study of weekly and twice-weekly bortezomib in combination with gemcitabine and cisplatin in the first-line treatment of patients with advanced solid tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 13(12), 3642–51.
- Wang, H.-Q., Du, Z.-X., Zhang, H.-Y., & Gao, D.-X. (2007). Different induction of GRP78 and CHOP as a predictor of sensitivity to proteasome inhibitors in thyroid cancer cells. *Endocrinology*, 148(7), 3258–70.
- Wang, Y., Rishi, A. K., Puliappadamba, V. T., Sharma, S., Yang, H., Tarca, A., Dou Q. P., Lonardo F., Ruckdeschel J. C., Pass H. I., Wali, A. (2010). Targeted proteasome inhibition by Velcade induces apoptosis in human mesothelioma and breast cancer cell lines. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 66(3), 455–66.
- Williams, S. A., & McConkey, D. J. (2003a). The proteasome inhibitor bortezomib stabilizes a novel active form of p53 in human LNCaP-Pro5 prostate cancer cells. *Cancer research*, 63(21), 7338–44.
- Williams, S., Pettaway, C., Song, R., Papandreou, C., Logothetis, C., & McConkey, D. J. (2003b). Differential effects of the proteasome inhibitor bortezomib on apoptosis and angiogenesis in human prostate tumor xenografts. *Molecular cancer therapeutics*, 2(9), 835–43.
- Willis, M. S., Townley-Tilson, W. H. D., Kang, E. Y., Homeister, J. W., & Patterson, C. (2010). Sent to destroy: the ubiquitin proteasome system regulates cell signaling and protein quality control in cardiovascular development and disease. *Circulation research*, 106(3), 463–78.
- Wu, W. K. K., Cho, C. H., Lee, C. W., Wu, K., Fan, D., Yu, J., & Sung, J. J. Y. (2010). Proteasome inhibition: a new therapeutic strategy to cancer treatment. *Cancer letters*, 293(1), 15–22.
- Wu, X., & Levine, A. J. (1994). p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(9), 3602–6.
- Wunderlich, A., Arndt, T., Fischer, M., Roth, S., Ramaswamy, A., Greene, B. H., Brendel C., Hintersseher U., Bartsch D. K., Hoffmann, S. (2011). Targeting the proteasome as a promising therapeutic strategy in thyroid cancer. *Journal of surgical oncology*, (September).

- Wunderlich, A., Roth, S., Ramaswamy, A., Greene, B. H., Brendel, C., Hinterseher, U., Bartsch D. K., Hoffmann, S. (2012). Combined inhibition of cellular pathways as a future therapeutic option in fatal anaplastic thyroid cancer. *Endocrine*.
- Xing, M. (2007). BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocrine reviews*, 28(7), 742–62.
- Yang, C. H., Gonzalez-Angulo, A. M., Reuben, J. M., Booser, D. J., Puztai, L., Krishnamurthy, S., Esseltine D., Stec J., Broglio K. R., Islam R., Hortobagyi G. N., Cristofanilli, M. (2006). Bortezomib (VELCADE) in metastatic breast cancer: pharmacodynamics, biological effects, and prediction of clinical benefits. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 17(5), 813–7.
- Yang, Y., Ikezoe, T., Saito, T., Kobayashi, M., Koeffler, H. P., & Taguchi, H. (2004). Proteasome inhibitor PS-341 induces growth arrest and apoptosis of non-small cell lung cancer cells via the JNK/c-Jun/AP-1 signaling. *Cancer science*, 95(2), 176–80.
- Yoshida, S., Iwase, S., Kurihara, S., Satorou, S., (2011) Proteasome inhibitor sensitizes oral squamous cell carcinoma cells to TRAIL-mediated apoptosis. *Oncology reports*, 25 (3), 645-52
- Yoshida, T., Shiraishi, T., Nakata, S., Horinaka, M., Wakada, M., Mizutani, Y., Miki T., Sakai, T. (2005). Proteasome inhibitor MG132 induces death receptor 5 through CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein. *Cancer research*, 65(13), 5662–7.
- Zavrski, I., Jakob, C., Kaiser, M., Fleissner, C., Heider, U., & Sezer, O. (2007). Molecular and clinical aspects of proteasome inhibition in the treatment of cancer. *Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progrès dans les recherches sur le cancer*, 176, 165–76.
- Zhu, H., Guo, W., Zhang, L., Wu, S., Teraishi, F., Davis, J. J., Dong F., Fang, B. (2005a). Proteasome inhibitors-mediated TRAIL resensitization and Bik accumulation. *Cancer biology & therapy*, 4(7), 781–6.
- Zhu, H., Zhang, L., Dong, F., Guo, W., Wu, S., Teraishi, F., Davis J. J., Chiao P. J., Fang, B. (2005b). Bik/NBK accumulation correlates with apoptosis-induction by bortezomib (PS-341, Velcade) and other proteasome inhibitors. *Oncogene*, 24(31), 4993–9.
- Zong, W. X., Edelstein, L. C., Chen, C., Bash, J., & Gélinas, C. (1999). The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis. *Genes & development*, 13(4), 382–7.
- Zwickl, P. (1999). An Archaeobacterial ATPase, Homologous to ATPases in the Eukaryotic 26 S Proteasome, Activates Protein Breakdown by 20 S Proteasomes. *Journal of Biological Chemistry*, 274(37), 26008–26014.

7.3 Verzeichnis meiner akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Universitätsprofessoren und Dozenten in Marburg:

Dr. Adamkiewicz	Dr. Dr. Mandrek
Prof. Dr. Basler	Prof. Dr. Moll
Prof. Dr. Baum	Prof. Dr. Dr. Mueller
Prof. Dr. Becker	Prof. Dr. Mutters
Prof. Dr. Czubayko	Prof. Dr. Neumüller
Prof. Dr. Dr. Daut	Prof. Dr. Oertel
Prof. Dr. Dr. Dettmeyer	Prof. Dr. Plant
Prof. Dr. Eilers	Prof. Dr. Renz
Dr. Feuser	Prof. Dr. Richter
Prof. Dr. Fuchs-Winkelmann	Prof. Dr. Rothmund
Prof. Dr. Grzeschik	Prof. Dr. Röhm
Dr. Grundmann	Prof. Dr. Ruchholtz
Prof. Dr. Hertl	Prof. Dr. Schäfer
PD Dr. Hoffmann	Prof. Dr. Sekundo
Prof. Dr. Hofmann	Prof. Dr. Vogelmeier
Prof. Dr. Jacob	Prof. Dr. Wagner
Prof. Dr. Kann	Prof. Dr. Werner
Prof. Dr. Klose	Prof. Dr. Wulf
Prof. Dr. Koolman	
Prof. Dr. Kruse	
Prof. Dr. Lill	
Prof. Dr. Lohoff	
Prof. Dr. Maier	

7.4 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. S. Hoffmann, Chefarzt der Chirurgie des Marien-Krankenhaus Bergisch Gladbach, für die Überlassung dieses interessanten Themas und für die Möglichkeit neben dem Studium Einblicke in die klinisch, experimentelle Forschung zu erlangen. Besonders möchte ich mich für die Begleitung, Unterstützung und Förderung während der gesamten Arbeitsphase bedanken.

Bei Annette, Susanne und Silvia möchte ich mich herzlichst für die Einführung und Einarbeitung in die Laborarbeit bedanken. Für das geduldige Anleiten und Erklären, für die aufgewendete Zeit und die praktischen Ratschläge sowie für die außerordentlich nette Zusammenarbeit, sodass ich immer gerne und mit einem Lächeln in die Tiefen des Universitätsgebäudes hinabgestiegen bin.

Annette, Dir möchte ich nochmals ganz besonders danken für die immerwährende Unterstützung -wochentags oder auch am Wochenende- für das Durchlesen der Dissertation, die erteilten Ratschläge und Dein unermüdliches Engagement. Vielen Dank.

Ich danke meiner Schwester Finja und meinen Freunden, welche mich mit Ihrer Hilfsbereitschaft und Freundschaft während des Studiums bereichert und unterstützt haben.

Meinem Mann Andreas möchte ich für die Begleitung während des gesamten Prozesses danken, angefangen bei den experimentellen Versuchen bis hin zum vollendeten Schriftstück, für das immer offene Ohr, die Unterstützung und Motivation.

Mein letzter Dank gilt meinen Eltern: mit Eurer ausnahmslosen Unterstützung, Eurer Zuversicht und Eurem Glauben an mich, habt Ihr mir die Sicherheit und Fähigkeit mit auf den Weg gegeben dieses Studium sowie diese Arbeit zu realisieren und zu vollenden. Ich danke Euch.